Wachstumsphysiologische Untersuchungen an fakultativ aeroben und mikroaeroben Rhodospirillaceae und Charakterisierung ihrer Elektronentransportsysteme

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Georg-August-Universität zu Göttingen

vorgelegt von
Heinrich Lehmann
aus Valparaiso / Chile

Göttingen 1976

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41534923_0010

Wachstumsphysiologische Untersuchungen an fakultativ aeroben und mikroaeroben Rhodospirillaceae und Charakterisierung ihrer Elektronentransportsysteme

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Georg-August-Universität zu Göttingen

vorgelegt von

Heinrich Lehmann
aus Valparaiso/Chile

Göttingen 1976

Diese Arbeit wurde im Institut für Mikrobiologie der Universität Göttingen durchgeführt.

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

D 7

Referent: Prof. Dr. N. Pfennig

Korreferent: Prof. Dr. H. G. Schlegel

Tag der mündlichen Prüfung: 29. 4. 76

Meiner Frau Christine gewidmet

VERWENDETE ABKÜRZUNGEN

Å	Ångström (= 10^{-10} m)
ae-D	aerob-Dunkel
an-L	anaerob-Licht
ATP	Adenosintriphosphat
aqua dem.	demineralisiertes Wasser
aqua dest.	destilliertes Wasser
Bchl.	Bacteriochlorophyll
CCCP	Carbonylcyanid-m-chlorophenylhydrazon
Cyt.	Cytochrom
DCPIP	2,6-Dichlorphenolindophenol
d	Schichtdicke, Schichtlänge (cm)
DH	Dehydrogenase
DMSO	Dimethylsulfoxid
E	Extinktion
E_A	Arrhenius-Aktivierungsenergie
EE	Enzymeinheiten (1 EE = 1 nmole · min^{-1} · mg $Prot^{-1}$)
EmM	millimolarer Extinktionskoeffizient
ETS	Elektronentransportsystem
F_p	Flavoprotein
GZ	ganze Zellen
H	Aktivierungsenthalpie
HQNO	2-n-Heptyl-4-hydroxychinolin-N-oxid
Konz.	Konzentration
$K_{0.5}$	Substratkonzentration für halbmaximale Reaktionsgeschwindigkeit
lx	Lux (= 1 Lumen/m^2)
mae-D	mikroaerob-Dunkel
max	maximal
NAD(H)	Nicotinamid-adenin-dinukleotid (reduziert)
Nl	Normliter (bei 1 atü und 20° C)
nmole	Nanomole (Mengenangabe)
nM	Nanomolar (Konzentrationsangabe)
o.D.	optische Dichte (= Trübung)
PMS	Phenazinmethosulfat

pO_2	Sauerstoffpartialdruck
PO_4-Puffer	Natriumphosphatpuffer
Prot.	Protein
R.	Rhodospirillum
Rp.	Rhodopseudomonas
RSA	Rinderserumalbumin
Sed.	sedimentierte Membranfraktion der Zellfraktionierung
spez. Bchl.	spezifischer Bacteriochlorophyllgehalt (μg/mg Protein)
spez. vO_2	spezifische Sauerstoffverbrauchsrate, während des Wachstums gemessen (nmole $O_2 \cdot min^{-1} \cdot$ mg Prot.$^{-1}$)
t	Zeit
t_d	Verdoppelungszeit bezogen auf die o.D.
T	Temperatur
TTFB	4.5.6.7-Tetrachlor-2-trifluor-methylbenzimidazol
TS	Trockensubstanz
Upm	Umdrehungen pro Minute
Üb	löslicher Überstand der Zellfraktionierung
% (v/v)	Prozent, Volumen bezogen auf Volumen
vO_2	Sauerstoffverbrauchsrate (nmole $O_2 \cdot min^{-1} \cdot ml^{-1}$)
vpm	Volumenanteil bezogen auf eine Million
%(w/v)	Prozent, Gewicht bezogen auf Volumen
μ	Wachstumsrate
μmole	Mikromole (Mengenangabe)
μM	mikromolar (Konzentrationsangabe)
v	Reaktionsgeschwindigkeit

Inhaltsverzeichnis

	Seite
I. EINLEITUNG	1
II. MATERIAL UND METHODEN	7
A. Organismen	7
B. Nährmedien	7
C. Kulturverfahren	9
1. Stammhaltung	9
2. Kulturverfahren zur Anzucht kleinerer Zellmengen	9
3. Standardbedingungen zur Fementeranzucht	11
D. Bestimmung der Wachstumsparameter	13
1. Trübungsmessung	13
2. Gesamtstickstoffbestimmung	14
3. Bacteriochlorophyllbestimmung	17
4. Trockengewichtsbestimmung	18
5. Zellzahlbestimmung	18
6. Substratverbrauch	19
7. Sauerstoffübergangsrate	19
8. Sauerstoffverbrauchsrate	20
E. Herstellung zellfreier Extrakte	23
F. Proteinbestimmung zellfreier Extrakte	24
G. Bestimmung der Atmungs- und Enzymaktivitäten	25
1. Spektralphotometrische Methoden	25
2. Manometrische Methoden	27
3. Polarographische Methoden	29
H. Cytochrombestimmung	32
I. Chemikalien	33

Seite

III. ENTWICKLUNG UND BETRIEB EINER FERMENTERANLAGE 35

Voraussetzungen 35

A. Gesamter Fermenteraufbau 36

1. Technische Konzeption 36
2. Fermentergefäß 39
3. Probenahme - Beimpfungsvorrichtung 45
4. Schaumbekämpfung 47

B. Meß- und Regeltechnik 49

1. Temperatur 49
2. pH-Regelung 49
3. Datenerfassung 53

C. Sauerstoff-Meß- und Regelanlage 54

1. Voraussetzungen 54
2. Methoden zur Messung des pO_2 54
3. pO_2-Elektroden 56
4. Paramagnetische Sauerstoffmessung 59
5. pO_2 Meß- und Regelanlage 60

D. Kontinuierliche Trübungsmessung 65

E. Beleuchtungsanlage 69

IV. EXPERIMENTE UND ERGEBNISSE ZUR WACHSTUMSPHYSIOLOGIE 73

A. Allgemeines zur Wachstumskinetik 74

B. Fakultativ aerobe Rhodospirillaceae 79

1. Wachstum anaerob im Licht 80

a. Schwachlicht 80
b. Starklicht 83
c. Zunehmende Lichtintensität 85

2. Wachstum aerob im Dunkeln 88

a. pO_2 159 u. 75 Torr 88
b. pO_2 50 Torr 90

Seite

c. pO_2 30 - 4,2 Torr 92
d. pO_2 8,4 und 0 Torr 95

3. Verhalten beim Übergang von anaerob-Licht auf aerob-Dunkel 99

4. Elektronenoptische Untersuchungen 102

C. Fakultativ mikroaerobe Rhodospirillaceae

Vorversuche 103

1. Wachstum anaerob im Licht 103

a. R. molischianum 105

α. 500 - 20.000 Lux 105
β. 22.000 - 85.000 Lux 107

b. R. fulvum 108

2. Wachstum aerob im Licht 110

a. R. fulvum 110

3. Wachstum im Wechsel von mikroaerob-Licht zu mikroaerob-Dunkel 112

a. R. photometricum 112

α. Regulation des Bchl.-Gehaltes 115
β. Kinetik des Wachstums 115
γ. Schlußfolgerungen 118

b. R. molischianum 119

α. Kinetik des Wachstums 119
β. Bchl.-Synthese 123
γ. Sauerstoffverbrauchsrate 123
δ. Schlußfolgerungen 124

4. Wachstum mikroaerob im Dunkeln 125

a. R. molischianum 125

α. pO_2 9 - 10 Torr 125
β. pO_2 4 - 7 Torr 130

Seite

b. R. fulvum 134

α. pO_2 12 - 25 Torr 134

β. pO_2 3 - 12 Torr 137

D. Zusammenfassung und vergleichende Gegenüberstellung der Wachstumsversuche 141

1. Wachstum anaerob im Licht 141

2. Wachstum aerob im Dunkeln 148

3. Wachstum aerob im Licht 155

V. EXPERIMENTE UND ERGEBNISSE ZUM ELEKTRONENTRANSPORT 158

1. Herstellung von zellfreien Extrakten 163

a. Aufschluß und fraktionierte Zentrifugation . 164

b. Elektronenoptische Untersuchungen 168

c. Lokalisation der Enzymaktivitäten in den Zell-Fraktionen 172

2. Aktivitäten von Enzymen der Elektronentransportkette in Abhängigkeit von den Wachstumsbedingungen 177

3. Charakterisierung von Enzymen der Elektronentransportkette 181

a. Rp. acidophila 181

α. NADH-Oxidase 181

β. Succinat-Oxidase 195

b. R. fulvum 206

α. NADH-Oxidase 206

β. Succinat-Oxidase 215

c. Tabellarische Zusammenstellung der Ergebnisse 223

4. Identifizierung und Lokalisation der Cytochrome 228

VI. DISKUSSION 239

VII. ZUSAMMENFASSUNG 252

VIII. LITERATURVERZEICHNIS 255

I. EINLEITUNG UND PROBLEMSTELLUNG

Phototrophe Nichtschwefel-Purpurbakterien vereinigen in sich eine in der Natur einzigartige Vielfalt von Stoffwechseltypen. Zur Energiegewinnung können sie anoxygene Photosynthese, aerobe Atmung, anaerobe Atmung (SATOH, HOSHINO u. KITAMURA 1974) sowie Gärung (KOHLMILLER u. GEST 1951; UFFEN u. WOLFE 1970) durchführen. Sie können Kohlendioxyd und atmosphärischen Stickstoff fixieren und freien Wasserstoff als Elektronendonator verwenden.

Photosynthese und Atmung sind an Membranen gebunden, alle phototrophen Organismen enthalten ein cyclisches und nach HIND u.OLSON (1968) ein nicht-cyclisches Elektronentransportsystem. Die nicht phototrophen, atmenden Organismen verfügen dagegen nur über ein nicht-cyclisches Elektronentransportsystem. Die Gärung ist im Gegensatz dazu auf die Substratphosphorylierung begrenzt und nicht an ein Elektronentransportsystem gebunden. Nach OLSON (1970) und BRODA (1970) läßt sich das respiratorische Elektronentransportsystem entwicklungsgeschichtlich vom photosynthetischen Elektronentransportsystem ableiten. Die anaerobe Atmung mit Sulfat oder Nitrat und die aerobe Atmung mit Sauerstoff als Elektronenakzeptor haben sich demzufolge nach der Photosynthese entwickelt. Die phototrophen Bakterien sind daher gute Modellsysteme zum Studium der Mechanismen der ATP-Bildung, sowie der Adaptation und Regulation des Elektronentransportes bei Photosynthese und Atmung.

Die Mehrzahl der Rhodospirillaceae ist fakultativ aerob, dazu gehören die vier von VAN NIEL (1944) aufgestellten Arten der Gattung Rhodopseudomonas. Innerhalb der Gattung Rhodospirillum unterschied VAN NIEL zwei Stammgruppen: fakultativ aerobe purpurfarbige Rhodospirillen (R. rubrum) und streng anaerobe braune Rhodospirillen (R. fulvum). GIESBERGER (1947) gelang es, zwei weitere Arten brauner Rhodospirillen zu isolieren: das schon von MOLISCH (1907) gefundene Rhodospirillum photometricum und R. molischianum.Sämtliche Stämme waren strikt anaerob, obwohl sie unter anderem aus Oberflächenwasser von Kanälen angereichert waren.

Die strikte Anaerobiosis der braunen Rhodospirillen, die schwierige Haltung der Kulturen und eine ausgeprägte morphologische Variabilität unter verschiedenen Kulturbedingungen (GIESBERGER 1947) könnten die Ursachen für die geringe Anzahl der seither durchgeführten Untersuchungen sein. SISTROM (1965) fand bei R. molischianum, daß Sauerstoff im Licht nicht das Wachstum hemmte. Anaerob und aerob im Dunkel konnte er kein Wachstum feststellen, aber trotzdem eine mit den fakultativ aeroben Rhodospirillaceae vergleichbare Atmungsaktivität messen. Im zellfreien Extrakt konnte er eine NADH-Oxidase-Aktivität nachweisen. SISTROM vertrat die Hypothese, daß R.molischianum kein ATP über den Atmungsstoffwechsel bilden könnte und die Energiegewinnung nur über die Photophosphorylierung möglich sei. Er fand, daß R.molischianum die gleiche Regulation der Bacteriochlorophyll(BChl)- und Carotinoidsynthese hatte wie die fakultativ aeroben Rhodospirillaceae. Bei diesen fanden COHEN-BAZIRE,SISTROM u.STANIER (1956), daß eine Erhöhung der Lichtintensität eine Abnahme des Photosynthesepigmentgehaltes bewirkte und eine Erniedrigung der Lichtintensität dessen Zunahme zur Folge hatte. Aerobe Bedingungen im Licht oder Dunkeln verursachten eine Unterdrückung der BChl- und Carotinoidsynthese.

Im Gegensatz zu der Annahme von SISTROM (1965), daß R. molischianum kein ATP über den Atmungsstoffwechsel bilden kann , steht die Beobachtung von PFENNIG (1970), daß Stämme aller drei Arten der braunen Rhodospirillen mikroaerob im Dunkeln wachsen können. In homogen beimpften Reagenzglas-Agarkulturen trat Wachstum unter aeroben Bedingungen im Dunkeln nur in scharf begrenzten, braun gefärbten Banden auf. Diese Banden befanden sich, je nach Stamm, 3 - 5 mm unter der Agaroberfläche. In parallel angesetzten,mit Paraffin verschlossenen Agarröhrchen konnte keinerlei Wachstum beobachtet werden. Pfennig nahm an, daß die braunen Rhodospirillen zur Energiegewinnung aerob im Dunkeln einen Teil des photosynthetischen Elektronentransportsystems benutzen. Der Befund von PFENNIG läßt folgenden Schluß zu: Die braunen Rhodospirillen verfügen über ein System, mikroaerob im Dunkeln Energie zu gewinnen. Es ist vom Sauerstoffpartialdruck abhängig und mit der Pigmentierung der Zellen verbunden. Die vorliegende Arbeit sollte deshalb der Klärung der folgenden Fragen dienen:

1. Können braune Rhodospirillen über lange Zeit mikroaerob im Dunkeln wachsen? Unter welchen Bedingungen ist dieses Wachstum möglich?

2. Verändern sich Funktion und Zusammensetzung des Elektronentransportsystems beim Übergang vom Wachstum anaerob im Licht zum Wachstum mikroaerob im Dunkeln? Läßt sich das Wachstum mikroaerob im Dunkeln auf Grund solcher Veränderung erklären?

Zur Beantwortung dieser Fragen wurden drei Arbeitshypothesen aufgestellt, die von bisherigen Untersuchungsergebnissen an fakultativ aeroben Rhodospirillaceae ausgehen:

1. Arbeitshypothese (zur Frage 1)

Das System der aeroben Energiegewinnung ist an Membranstrukturen mit einem hohen Gehalt an Photosynthesepigmenten gebunden. Das mikroaerobe Wachstum von R. molischianum und analog dazu auch der restlichen braunen Rhodospirillen, ist an einen pO_2 gebunden, bei welchem die Synthese dieser Membranen nicht durch Sauerstoff reprimiert wird. Der "kritische" pO_2 - Bereich für die Derepression der Bchl-Synthese könnte wie bei den fakultativ aeroben Arten im Bereich von 20-4 Torr liegen und dadurch ein mikroaerobes Wachstum nur in diesem Bereich möglich sein. Trifft diese Hypothese zu, so müßte das Wachstum mikroaerob im Dunkeln indirekt vom Bchl-Gehalt der Zellen abhängig sein. Ist das mikroaerobe Wachstum nicht mit einem bestimmten Bchl-Gehalt korreliert, dann wäre die Ursache in einer Regulation des Mechanismus zur Energiegewinnung zu suchen.

Diese Hypothese kann auf Grund folgender Untersuchungsergebnisse an fakultativ aeroben Rhodospirillaceae aufgestellt werden: Bei mehreren Arten fanden BIEDERMANN et al.(1969) und DREWS, LAMPE u. LADWIG (1969) in aeroben Dunkelkulturen, je nach Art eine unterschiedliche Abhängigkeit der Wachstumsrate vom pO_2. Bei einem pO_2 unter 20 Torr wurde die BChl-Synthese dereprimiert. GIBBS, SISTROM u. WORDEN (1965) entdeckten bei R. molischianum eine Abhängigkeit des Bchl-Gehaltes vom Membrangehalt der Zellen. DAVIES et al. (1973) zeigten, daß die Regulation der Bchl-Synthese durch Sauerstoff und Licht wahrscheinlich durch Interaktion mit der Elektronentransportkette erfolgt.

2. Arbeitshypothese (erste Alternative zur Frage 2)
Die braunen Rhodospirillen haben ein nicht-cyclisches Elektronentransportsystem, welches auch anaerob im Licht ausgebildet wird. Dieses System wird außerdem bei einem pO_2 im Dunkeln ausgebildet, bei welchem die BChl-Synthese möglich ist. Die spezifischen Aktivitäten der Bestandteile des Elektronentransportsystems ändern sich nicht bei mikroaerobem Dunkelwachstum; die ATP-Bildungsrate für dieses System dürfte geringer sein als bei den nicht-cyclischen aeroben Elektronentransportsystemen und entsprechend die Wachstumsrate niedriger sein.

3. Arbeitshypothese (zweite Alternative zur Frage 2)
Braune Rhodospirillen verfügen über ein zweites, aerobes und nicht-cyclisches Eelektronentransportsystem, zusätzlich zu dem in der vorigen Hypothese postulierten. Dieses hat ein niedriges pO_2-Optimum; es kann durch Aktivitätserhöhung der Elektronentransportbestandteile in einem System ähnlich dem in der 2. Hypothese geforderten und/oder durch die Bildung neuer Elektronentransportbestandteile entstehen.

Die Arbeitshypothesen 2 und 3 wurden aufgestellt aufgrund folgender Untersuchungsergebnisse über den aeroben Elektronentransport an fakultativ aeroben Rhodospirillaceae: THORE, KEISTER u. SAN PIETRO (1969) fanden bei aerob gewachsenen Zellen eine viermal höhere Aktivität der NADH- und Succinat-Oxidase als in anaerob im Licht angezogenen Zellen. Bei aerob angezogenen Rp.capsulata entdeckten KLEMME u. SCHLEGEL (1969) eine um das Zehnfache erhöhte Cytochrom c - Oxidase - Aktivität. Eine Änderung am "Ende" der Elektronentransportkette fanden auch SASAKI, MOTOKAWA u. KIKUCHI (1970): Aerobe Zellen von Rp. sphaeroides hatten eine Endoxidase vom a-Typ, während anaerob in Licht gewachsene Zellen eine vom o-Typ hatten. In Abhängigkeit vom pO_2 fanden SAUNDERS u. JONES (1974) eine Erhöhung des Cytochrom a-Gehaltes. Diese und weitere Untersuchungsergebnisse ergeben folgendes Bild vom Elektronentransport fakultativ aerober Rhodospirillaceae:
Die anaerob im Licht gewachsenen Zellen verfügen über ein cyclisches und ein nicht cyclisches Elektronentransportsystem. Während das cyclische ausschließlich in der Photosynthese aktiv ist, kann das nicht-cyclische auch unter aeroben Bedingungen im Dunkeln Energie gewinnen (YAMASHITA et al. 1967) . Zu-

sätzlich wird aerob im Dunkeln ein nicht-cyclisches, aerobes Elektronentransportsystem gebildet. Dieses System kann aus Teilbereichen des anaerob im Licht gebildeten bestehen.

Die Prüfung der 2. und 3. Arbeitshypothese erfordert vergleichende Untersuchungen der Elektronentransportsysteme anaerob im Licht und mikroaerob im Dunkeln gewachsener brauner Rhodospirillen. Diese Ergebnisse sollten dann Befunden an fakultativ aeroben Rhodospirillaceae gegenübergestellt werden. Zwar wurden die Elektronentransportsysteme verschiedener Arten fakultativ aerober Rhodospirillaceae durch die zuvor genannten Autoren zum Teil sehr gut untersucht, dies jedoch stets unter verschiedenen Teilaspekten und mit verschiedenen Methoden, so daß ein Vergleich mit Befunden an mikroaeroben Arten nicht ohne weiteres möglich ist.

Als fakultativ aerober Vergleichsorganismus wurde die von PFENNIG (1969) isolierte und hinsichtlich Wachstumsphysiologie und Elektronentransport noch nicht charakterisierte fakultativ aerobe Rhodospirillacee Rhodopseudomonas acidophila gewählt.

Die Wachstumsversuche erfordern die Anzucht phototropher Bakterien anaerob im Licht und mikroaerob im Dunkeln. Die Wachstumsbedingungen, insbesondere p^{O}_{2} und Beleuchtung, sollten exakt reproduzierbar sein und eine Variabilität mit eng begrenzten Toleranzen haben. Zur Untersuchung des Elektronentransportsystems werden größere Mengen Zellmaterial im nativen physiologischen Zustand benötigt. Für diesen Zweck erscheint ein diskontinuierliches Anzuchtsverfahren am besten geeignet.

In diesem Verfahren ändern sich die Wachstumsparameter kontinuierlich, was auch eine kontinuierliche Kompensation des p^{O}_{2} und der Beleuchtungsstärke erfordert. Die technischen Einrichtungen zur Beleuchtung und Sauerstoffversorgung sollten daher entsprechende Regelsysteme aufweisen. Die Anzucht der Bakterien unter extrem niedrigem Sauerstoffgehalt oder geringer Beleuchtungsstärke erfordert lange Verweilzeiten im Anzuchtsgefäß mit sehr hohen Anforderungen an die Regeleinrichtungen und besondere Vorkehrungen gegen Infektionen. Kulturgefäße und Regeleinrichtungen, welche solche Anforderungen erfüllen, waren kommerziell nicht

erhältlich, die Durchführung der Arbeit aber von diesen Einrichtungen abhängig. Daher nimmt die Beschreibung der Konstruktion der Fermenteranlage in dieser Arbeit einen größeren Raum ein.

II. MATERIAL UND METHODEN

A. Organismen

Rhodopseudomonas acidophila	St. 7050 (DSM 137)	PFENNIG (1969)
	St. 10350 (DSM 148)	
Rhodospirillum fulvum	St. 10060 (DSM 115)	
Rhodospirillum molischianum	St. 131 (DSM 120)	GIESBERGER (1947)
Rhodospirillum photometricum	St.NTHC 132 (DSM 122)	PFENNIG u. TRÜPER (1971)

Die Bakterienstämme wurden von der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen (DSM) in Göttingen zur Verfügung gestellt. Für Versuche mit fakultativ aeroben Rhodospirillaceen wurde Rp. acidophila, für die Versuche mit fakultativ mikroaerob wachsenden Rhodospirillaceen wurden R. fulvum, R. molischianum und R. photometricum eingesetzt.

B. Nährmedien

B 1. Nährlösung pH 5,6 nach PFENNIG (1969), verändert, zur Anzucht von Rhodopseudomonas acidophila.

Spurenelementlösung SL 6	1 ml	1,5 ml*
KH_2PO_4	0,5 g	
$MgSO_4 \cdot 7 H_2O$	0,4 g	
NaCl	0,4 g	
NH_4Cl	0,4 g	0,6 g*
$CaCl_2 \cdot 2 H_2O$	0,1 g	
Na-Succinat (H_2O-frei)	1,0 g	3,0 g*
Eisencitrat-Lösung (100mg/100ml)	5,0 ml	
Aqua dest. ad 1000 ml		

(* Zur Gewinnung von Zellmaterial im Fermenter.)

Die Nährlösungsbestandteile wurden in der angegebenen Reihenfolge in Aqua dest. gelöst und der pH-Wert auf 5,6 (Sterilfiltration) oder pH 5,7 (Hitzesterilisation) mit H_2SO_4 eingestellt. pH-Wert vor der Beimpfung: 5,6.

B 2. Nährlösung pH 6,6 nach PFENNIG (1978), verändert, zur Anzucht von R. molischianum, R. fulvum und R. photometricum.

Spurenelementlösung SL 6	1,0 ml	1,5 ml*
KH_2PO_4	0,5 g	
$MgSO_4 \cdot 7 H_2O$	0,4 g	
NaCl	0,4 g	
NH_4Cl	0,4 g	0,6 g*
$CaCl_2 \cdot 2 H_2O$	0,05 g	
Na-Succinat (H_2O-frei)	1,0 g	2,5 g*
Hefeextrakt	1,0 g	1,25 g*
Äthanol (unvergällt)	0,5 ml	0,75 ml*
Eisencitrat-Lösung (100mg/100ml)	5,0 ml	
Aqua dest. ad 1000 ml		

(* Zur Gewinnung von Zellmaterial im Fermenter.)

pH-Wert 6,6 (Sterilfiltration) oder 6,7 (Hitzesterilisation).
pH-Wert vor der Beimpfung: 6,6.

B 3. Spurenelementlösung SL 6, nach PFENNIG (1974), 10fach konzentriert.

$ZnSO_4 \cdot 7 H_2O$	100 mg
$MnCl_2 \cdot 4 H_2O$	30 mg
H_3BO_3	300 mg
$CoCl_2 \cdot 6 H_2O$	200 mg
$CuCl_2 \cdot 2 H_2O$	10 mg
$NiCl_2 \cdot 6 H_2O$	20 mg
$Na_2MoO_4 \cdot 2 H_2O$	30 mg
Aqua dest. ad 1000 ml	

B 4. Sterilisation der Nährlösungen

Kleinere Mengen in Flaschen wurden in eloxierten Aluminiumbehältern mit einer Filz- und Pergamentpapierabdeckung im Autoklaven bei 120°C sterilisiert. Fermenteransätze wurden mit Seitz-Filterschichten (Seitz- Werke, Bad Kreuznach Kat.Nr. EKS 1618) im Seitz-Einschichten-Filtergerät EF 14/0 sterilfiltriert: Die Nährlösung wurde in einen Druckbehälter (Cornelius Apparate GmbH, Langenfeld) überführt und dann mit 2 - 3 atü Stickstoff durch die sterilisierten Filter gedrückt.

C. Kulturverfahren

C 1. Stammhaltung

Die Kulturen phototropher Bakterien wurden in flüssigem Medium in 50 ml Schraubverschlußflaschen bei ca. 5°C aufbewahrt. Für jeden Stamm wurden getrennte Stamm- und Vorkulturen gehalten. Bei Rp.acidophila erfolgte eine Überimpfung im zweimonatigen Rhythmus, während diese bei den restlichen Stämmen alle 14 Tage erfolgen mußte. Vor jeder Überimpfung wurden die Flaschen ca. einen halben Tag bei Raumtemperatur und Tageslicht reaktiviert und nach der Überimpfung bei Raumtemperatur 10 h im Dunkeln aufbewahrt (Veratmung des gelösten Sauerstoffs); anschließend erfolgte die Bebrütung im Licht bei 28°C (siehe C 2), bis die Kulturen halb ausgewachsen waren. Hauptkulturen wurden mit aktivem Zellmaterial aus zwei- bis dreimal hintereinander wiederholten Vorkulturen beimpft.

C 2. Kulturverfahren zur Anzucht kleinerer Zellmengen

a) Wachstum anaerob im Licht

Klare Glasschraubverschlußflaschen (100 u. 500 ml) mit Nährlösung wurden mit 1 % einer phototroph gewachsenen Vorkultur beimpft und, zur Veratmung des gelösten Sauerstoffs, 10 h im Dunkeln aufbewahrt. Das Wachstum erfolgte bei 28°C und einer Beleuchtungsstärke von 1000 - 2000 Lux (handelsübliche 100 Watt

Glühbirnen). Die Zellen wurden dann am Ende der exponentiellen Wachstumsphase, nach ca. 48 h, geerntet.

b) Wachstum aerob im Dunkeln

Die Beimpfung erfolgte mit 1 % einer phototroph gewachsenen Vorkultur und die Anzucht in 1000 ml Erlenmeyerkolben mit Schikanen und 500 ml Nährlösung. Um eine Befeuchtung des Wattestopfenverschlusses durch Spritzer zu vermeiden, wurde an dem mit einem Gewinde versehenen Kolbenhals ein aus Glas angefertigter Spritzfänger (mit Wattestopfen) angeschraubt (Abb.II 1).

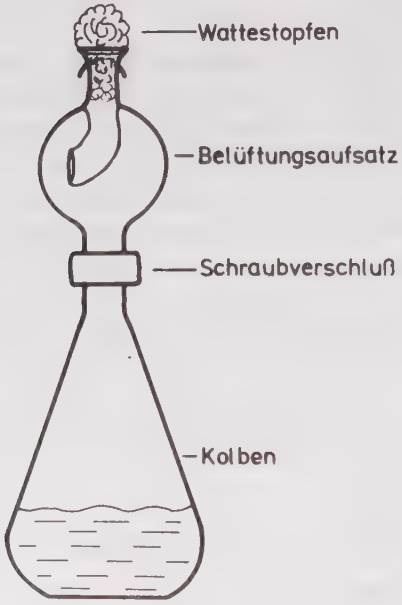


Abb.II 1: Belüftungsaufsatz mit Spritzfänger

Belüftungsaufsatz und Kolbenhals mit Gewinde. Schraubverschluß der Fa.Sovirel. Der Wattestopfen wurde während des Schüttelvorganges mit einem Gummiband gesichert (Haken am Belüftungsaufsatz).

Dieser Spritzfänger ermöglichte hohe Schüttelfrequenzen und dadurch eine bessere Belüftung der Kultur. Die üblicherweise mit 100 ml gefüllten Erlenmeyerkolben(mit 1000 ml Gesamtvolumen) konnten so bis zu 500 ml Nährlösung gefüllt werden. Die Belüftung erfolgte durch Schütteln auf einer Schüttelmaschine (Type RC - 106, Finfors A.G., Basel) mit 170 - 180 Upm . Die Zellen wurden nach 36 - 48 h am Ende der exponentiellen Wachstumsphase geerntet. Die Anzuchttemperatur war 28°C.

c) Wachstum mikroaerob im Dunkeln

Mikroaerobes Wachstum bis zu hohen Zelldichten konnte nur bei genau eingestelltem pO_2 im Fermenter erzielt werden (siehe Abschnitt C 3). Bis zu zwei Verdopplungen (gemessen anhand der Trübung) wurden in 300 ml Erlenmeyerkolben mit 100 ml Nährlösung erreicht. Der Nährlösung wurde nach dem Autoklavieren sterilfiltriertes Na-Thioglycolat bis zur Endkonzentration von 0,02 % zugesetzt und mit 5 % einer phototroph gewachsenen Vorkultur beimpft. Die Bebrütung erfolgte bei 28°C im Dunkeln.

C 3. Standardbedingungen zur Fermenteranzucht

Das Wachstum der Bakterien erfolgte in der in Kap. III beschriebenen Fermenteranlage. Die Zusammensetzung der Nährlösung für Fermenteranzucht ist in Abschnitt B beschrieben.

Das Fermentergefäß, der Pump-Kreislauf für die kontinuierliche Trübungsmessung, die pH-Korrekturmittel, das Filtrationsgerät für die Nährlösung und die Flaschen zur Probenahme wurden 30 min bei 120°C im Autoklaven sterilisiert. Dann wurde die Nährlösung direkt in das Fermentergefäß sterilfiltriert.

Vor der Beimpfung des Fermentergefäßes wurde eine 24h-Sterilitäts- und Funktionsprüfung durchgeführt: Der mit steriler Nährlösung gefüllte Fermenter wurde bei der Betriebstemperatur von 28°C $\pm$0,1 und Belüftung mit Luft gefahren, hierbei wurden die

Eichung der pH- und pO_2-Elektrode und die Funktion der pO_2-Regelanlage und die der kontinuierlichen Trübungsmessung überprüft.

Während des Wachstums wurde der pH-Wert mit der pH-Regelanlage auf $\pm$ 0, pH konstant gehalten. Die Neutralisation erfolgte mit 1 N H_2SO_4 oder 0,1 N NaOH. Die verbrauchte Säuremenge entsprach dem Verbrauch des Substrates Na-Succinat; nach dem Verbrauch von ca. 80 % des Substrates durch die Bakterienkultur wurde neues Substrat steril zugegeben. Die kontinuierliche Trübungsmessung erfolgte bei 691 nm gegen einen Leerwert mit steriler Nährlösung.

Die Probenahme erfolgte immer in sterilen Flaschen. Außer einer direkten mikroskopischen Kontrolle auf Fremdorganismen wurden die Proben auch in AC-Medium (Difco Lab.,Detroit) geimpft, 24 h bei 30°C im Dunkeln bebrütet und dann mikroskopiert.

Von der Probenflüssigkeit wurden 6 x 5 - 50 ml mit 1 atü Stickstoff durch Membranfilter gedrückt und dann je 3 Filter zur Trockengewichtsbestimmung und Kjeldahl-Stickstoffbestimmung verwendet.

Wachstum anaerob im Licht:

Der Fermenter wurde mit 1 % einer phototrophen Vorkultur beimpft. Vor der Beimpfung wurde das mit Nährlösung gefüllte Fermentergefäß 30 min. mit Stickstoff begast (40 Nl/min Stickstoff "spezial" Fa.Messer, Griesheim). Die Rührdrehzahl war 400 Upm. Die Anfangsbeleuchtungsstärke von 540 - 4000 Lux wurde mit zunehmender Zelldichte bis auf 80.000 Lux erhöht,so daß der effektive Lichtgenuß der Zellen konstant blieb. Der Probenahmekopf (Abb.III5) wurde vor der Probenahme mit Stickstoff gespült und dann die ganze Vorrichtung durchgeblasen.

Wachstum aerob und mikroaerob im Dunkeln:

Das Fermentergefäß wurde mit schwarzen Tüchern abgedunkelt und mit 600 Upm gerührt. Die aeroben Kulturen wurden mit 5 % einer aeroben Vorkultur beimpft und mikroaerobe Ansätze mit 1 % einer

phototrophen Vorkultur beimpft, dann phototroph im Fermenter vorkultiviert und bei einer Extinktion von0,2 auf mikroaerobe Wachstumsbedingungen umgeschaltet.

Die Begasung aerober Ansätze erfolgte mit Druckluft + 2 % CO_2, die der mikroaeroben Ansätze mit einem Gasgemisch aus 10 - 20 % Druckluft, 2 % CO_2 und 78 - 88 % N_2. Alle Versuche wurden mit der pO_2-Mess- und Regelanlage (s.Kap. III) gefahren, die Begasungsrate wurde hierdurch automatisch dem Sauerstoffbedarf der Kulturen angepaßt. Die pO_2-Elektrode wurde jeweils 24 h und 1 h vor der Beimpfung geeicht.Der Nullpunkt wurde durch Begasung mit Stickstoff "spezial" (O_2 =5 vpm), der 100%-Punkt durch Begasung mit Druckluft eingestellt und um den barometrischen Luftdruck korrigiert. Der elektrische Nullpunkt und, nach Möglichkeit, der obere Eichpunkt, wurden während des Wachstumsversuches überprüft und eventuell nachgeeicht. Nach Abschluß des Wachstums wurden der 0- und 100 %-Punkt der pO_2-Elektrode in dem mit Leitungswasser gefüllten Fermentergefäß überprüft und bei Abweichungen die aufgezeichneten pO_2-Werte um die Drift des Eichpunktes korrigiert.

Die Probenahmevorrichtung wurde bei aerober Anzucht vor der Probenahme mit Luft durchgeblasen; bei mikroaerober Anzucht wurde,wie bei der anaeroben beschrieben,verfahren. Zur Vermeidung von Kondensatbildung wurde der Abluftsterilfilter und die Abluftleitung bis zum Abluftkondensator auf ca. 50°C aufgeheizt.

D. Bestimmung der Wachstumsparameter

D 1.Trübungsmessung:

Das Wachstum von Flüssigkeitskulturen wurde anhand der Trübungszunahme bestimmt. Die Messung erfolgte in Glasküvetten aus optischem Spezialglas mit 0,5, 1,0 und 2,0 cm Schichtstärke, wobei die Auswahl so getroffen wurde, daß die Extinktion im Bereich von 0,2 - 0,8 Extinktionswert lag, bei stärkerer Trübung

wurde mit Aqua dest. verdünnt. Gemessen wurde im Absorptionsminimum des Bchl. bei 650 nm gegen aqua dest. mit einem Zeiss PMQ II Spektralphotometer.

D 2. Gesamt-Stickstoffbestimmung an ganzen Zellen anstelle der üblichen Proteinbestimmung:

In umfangreichen Versuchsreihen wurde zunächst versucht, die colorimetrische Proteinbestimmung nach der von SCHMIDT et al. (1963) modifizierten Methode von LA RIVIÈRE (1958) bei phototrophen Bakterien anwendbar zu machen. Da besonders bei Rp.acidophila-Stämmen die für die Proteinbestimmung notwendige vollständige Extraktion der im gleichen Wellenlängenbereich absorbierenden Carotinoide unmöglich war, traten bei Parallelbestimmungen erhebliche Differenzen auf. Als einheitliche Bezugsgröße wurde deshalb in allen Fällen der Gesamtstickstoffgehalt der Zellen bestimmt und, wo notwendig, auf Protein umgerechnet. Die Umrechnung von Stickstoff in Protein erfolgte durch Multiplikation des Gesamtstickstoffgehaltes mit $\frac{100}{16} = 6{,}25$, in der Annahme, daß das Eiweiß 16 % Stickstoff enthält (HILLER et al. 1948). Ein nachträglicher Vergleich der so ermittelten Proteinwerte mit den durch die Biuretmethode bestimmten Werten (Abb.II 2)ergab einen Umrechnungsfaktor von 7,63 (13,1 % Stickstoff im Protein), so daß die in dieser Arbeit berechneten Proteinwerte etwas niedriger liegen als die mit der Biuretmethode ermittelten.

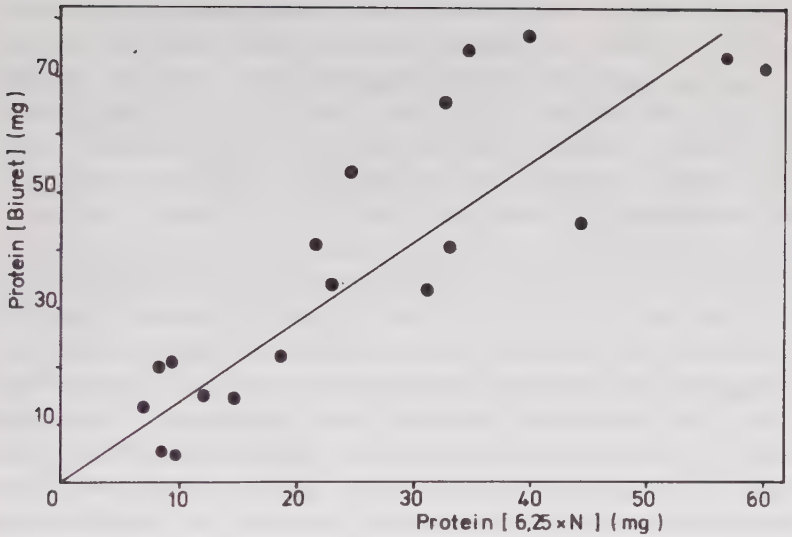


Abb.II 2: Korrelation zwischen dem nach der Biuretmethode ermittelten Proteingehalt und den in dieser Arbeit verwendeten Proteinwerten (= Kjeldahl-Stickstoff x 6,25).

Die Proteinbestimmungen wurden nach beiden Methoden mit zellfreien Extrakten (lösliche und Sediment-Fraktion) aus phototroph und heterotroph angezogenen Rp. acidophila durchgeführt. Die einzelnen Messpunkte sind aus unterschiedlichen Zellaufschlüssen entnommen und stellen die Mittelwerte aus drei Messungen dar.

Stickstoffbestimmung nach der halbmikro-Kjeldahlmethode:

Die hier angewendete Methode ist durch Abwandlung der von HUMPHRIES (1956) beschriebenen entstanden. Die Proben, je nach Trübungsgrad 5 - 100 ml, wurden durch Membranfilter aus Celluloseacetat (Best.-Nr. 11106, 47 mm Durchmesser, Sartorius-Membranfilter GmbH, Göttingen) gepreßt, das Filter zusammengerollt und in einem 50 ml Kjeldahlkolben (Quickfitt Nr.22/50) eingeführt. Für den Aufschluß kamen elektrische Spiegelbrenner der Fa. Bühler, Tübingen zur Anwendung. Der Kolbeninhalt wurde mit 1 ml konzentrierter Schwefelsäure und einer Spatelspitze Selenreaktionsgemisch (Merck Kat.Nr. 8030) versetzt und zur Verdampfung des Wassers in der Probelösung 15 min auf 100°C erhitzt; anschließend, bis zum Klarwerden des Kolbeninhaltes, erfolgte eine Erhitzung auf ca. 600°C gleichbleibender Temperatur und abschließend eine 30 min dauernde Nacherhitzung. Bei Proteinmengen $<$ 20 mg hat sich eine Aufschlußzeit von 2 1/2 h als ausreichend erwiesen, sie erbrachte die höchste N-Rückgewinnung. Die Destillation erfolgte in einem modifizierten Kjeldahl-Destillationsaufsatz (Nr. MC 21) der Fa. Quickfitt, der Ausgang des Aufsatzes war mit einem kombinierten Allihn-Spiralkühler, der Eingang mit einem Wasserdampfgenerator verbunden. Der Schliff und Hals des Aufschlußkolbens wurde zur Abspülung von Spritzen aus der Probe und zur Freisetzung von Hydratationswärme, mit etwa 2 - 3 ml Aqua dest. betropft. Nach dem Anschluß des Aufschlußkolbens an den Destillationsaufsatz wurde der Inhalt mit ca. 8 ml 30 % $^{w}/_{v}$ NaOH versetzt und 5 min mit Wasserdampf in eine Vorlage mit 10 ml 2 % $^{w}/_{v}$ Borsäure überdestilliert. Das als Ammoniumborat gebundene Ammoniak wurde mit 0,02 N H_2SO_4 auf den durch eine Titrationskurve ermittelten Äquivalenzpunkt von pH 4,75 titriert. Die Titration erfolgte mit einem automatischen Titrator der Fa. Metrohm, CH-9100 Herisau, bestehend aus pH-Meter E 500, Impulsomat E 473 und Multi-Dosimat E 415.

Berechnung:

$$N = T \times N\ Sre. \times Äquiv.\ Gew.N$$

N = Stickstoffgehalt der Probe in mg

T = Titrationswert minus Leerwert (ml)

N Sre. = Normalität der Säure

Äquiv.Gew.N = Äquivalentgewicht von N = 14.

Bei Verwendung von 0,02 N H_2SO_4 und einem Umrechnungsfaktor von 6,25 ist der Proteingehalt (P_N)

$$P_N = T \times 1{,}75$$

D 3. Bacteriochlorophyllbestimmung nach KLEMME (1967), verändert.

5 bis 10 ml der Probe wurden bei 4000 x g zentrifugiert, der Überstand mit einer Wasserstrahlpumpe abgesaugt und das Sediment bis zur Bestimmung bei -20°C aufbewahrt. Zur Bestimmung wurde das Sediment aufgetaut und auf ein Volumen von 1 ml mit Aqua dest. gebracht. Nach einer Durchmischung erfolgte eine von der Farbintensität abhängige Zugabe von 5 - 10 ml eiskaltem Methanol (mit anschließender Durchmischung). Zur Extraktion wurde die Probe 20 min bei Temperaturen $< 5°C$ im Dunkeln aufbewahrt und dann 5 min bei 5000xg zentrifugiert; die Messung des BChl-Gehaltes im Überstand der Proben erfolgte je nach Farbintensität mit 0,5, 1,0 oder 2,0 cm Küvetten bei 775 nm gegen einen Leerwert. Um eine Ausbleichung des BChl durch Licht zu vermeiden, wurden die Proben während des gesamten Prozesses weitgehend im Dunkeln gehalten.

Zur Berechnung der BChl-a-Konzentration kam der von COHEN-BAZIRE und SISTROM (1966) angegebene Extinktionskoeffizient für BChl a in methanolischer Lösung ($E_{775} = 60\ mM^{-1} \cdot cm^{-1}$) zur Anwendung.

Berechnung der BChl a - Konzentration:

$$c_{BChl\ a} = \frac{E_{775} \cdot 1000 \cdot \text{Verd.-Faktor}}{65{,}8 \cdot d} \quad \left[\frac{\mu g}{ml}\right]$$

d = Schichtstärke der Küvette

$$\text{Verdünnungs-Faktor} = \frac{\text{Endvolumen nach Extraktion [ml]}}{\text{Anfangsvolumen vor Extraktion [ml]}}$$

D 4. Trockengewichtsbestimmung:

Die Bestimmung erfolgte mit der Membranfiltermethode. Membranfilter aus Cellulose-Nitrat (Sartorius-Membranfilter GmbH, Göttingen, Nr.11307, 47 mm Durchmesser) wurden 8 h bei 80°C in Abdampfschalen getrocknet, 24 h über trockenem Kieselgel im Exsikkator äquilibriert und dann ausgewogen (Leerfilter). Nach Befeuchtung der Leerfilter mit Aqua dest. erfolgte die Filtration der Proben (5 - 100 ml) mit 1 - 2 atü in Druckfiltrationsgeräten der Fa.Sartorius, Göttingen (Kat.Nr.SM 16510). Die Filter mit dem Zellmaterial wurden dann in gleicher Weise wie die Leerfilter getrocknet und ausgewogen.

D 5. Zellzahlbestimmungen:

Zellzählungen erfolgten mit Hilfe von Zählkammern Typ NEUBAUER-neu, welche zwischen den Zählungen zur Erleichterung der Probenauftragung in einer feuchten Kammer aufbewahrt wurden. Waren die Zellen verklumpt, so wurde die Suspension vor der Auszählung homogenisiert; enthielt die Probe > 100 Zellen je Großquadrat, so wurde entsprechend verdünnt. Pro Zellzahlbestimmung kamen 3 parallele Zählkammerfüllungen zur Auszählung.

D 6. Substratverbrauch:

Die Verwertung des Substrates Na-Succinat durch die phototrophen Bakterien führt zu einem Zurückbleiben von Natriumionen, die über einen Titrator mit Schwefelsäure neutralisiert wurden.

$$2\ Na_2C_4H_4O_4 + 5\ H_2O \longrightarrow 7\ CH_2O + CO_2 + 4\ NaOH$$

Die pro Zeiteinheit zur Neutralisation der Na-Ionen verbrauchte Säuremenge entspricht der durch die Zellen assimilierten Bernsteinsäure.

D 7. Sauerstoffübergangsrate:

Die Messung erfolgte mit der Sulfitoxydationsmethode nach COOPER et al. (1944), modifiziert.

Reagenzien:
0,1 N $Na_2S_2O_3$ (Titrisol, Merck Darmstadt)
0,1 N Jod-Lösung (" " ")
Kupfersulfatlösung: gesättigte $CuSO_4 \cdot 5\ H_2O$ Lösung
Stärkelösung: 5 g/1000 ml
Sulfitlösung: 1 N Na_2SO_3
Sämtliche Lösungen wurden mit Aqua dest. angesetzt.

Messung:
Aqua dest. wurde im Gefäß auf die gewünschte Temperatur gebracht, das Natriumsulfit (63,03 g Na_2SO_3/1 H_2O) zugegeben und nach Lösung 1 ml Kupfersulfatlösung pro l hinzugefügt. Danach wurden Belüftung und Rührung angestellt und nach 10 min die Nullprobe entnommen.

Probenvolumina von 5 ml wurden mit einer 10 ml Pipette oder 5 ml Spritze mit Nadel entnommen. Die Probeentnahmegeräte wurden 5 min. vor Probenahme mit Stickstoff gespült. Die Probe-Sulfitlösung wurde in einer Vorlage von 30 bis 100 ml Jodlösung pipettiert und darauf geachtet, daß sich die Nadel oder Pipettenspitze bei der Entleerung knapp über der Jodoberfläche befand,

um eine weitere Oxydation des Sulfits zu vermeiden. Die Proben wurden in Abständen von 10 min. entnommen. Die Vorlage mit der Probe wurde mit 1 ml Stärkelösung versetzt und das nicht vom Sulfit reduzierte elementare Jod mit der Thiosulfatlösung bis zur Entfärbung des Stärkeindikators titriert. Die Jodlösung wurde vor der Titration mit zwei Tropfen 1 N H_2SO_4 angesäuert, da die Titration mit Thiosulfat nur im sauren Bereich quantitativ verläuft (JANDER u. JAHR 1959).

Andere Autoren (KÖNIG 1967) erzielten ebenfalls gute Ergebnisse bei Verwendung von Cobaltsulfat in einer Endkonzentration Co^{++} 10^{-4}M als Katalysator anstelle des Kupfersulfats.

D 8. Sauerstoffverbrauchsrate

Der Sauerstoffverbrauch wachsender Bakterienkulturen im Fermenter wurde mit der in Kap. III C beschriebenen Sauerstoff-Meß- und Regelanlage erfaßt. Zwei Ausbaustufen kamen zur Anwendung: Die erste hatte eine intermittierende Begasung mit Magnetventilen; nur die Sauerstoffkonzentration der Abluft und der pO_2-Wert im Kulturmedium wurden aufgezeichnet. Die Begasung in der zweiten Ausbaustufe erfolgte kontinuierlich über ein ferngesteuertes Nadelventil; außer der Sauerstoffkonzentration der Abluft und dem pO_2 wurde auch die Sauerstoffkonzentration der Zuluft und die Gasdurchflußrate und der Kohlendioxidgehalt der Abluft aufgezeichnet.

In der ersten Ausbaustufe der O_2-Meß- und Regelanlage wurde nur ein Teil der Daten zur Berechnung der Sauerstoffverbrauchsrate (in Gleichung 3) kontinuierlich aufgezeichnet; die noch fehlenden Meßdaten wurden folgendermaßen ermittelt: Die O_2-Konzentration der Zuluft (a_1) wurde nach Einstellung der Gasmischung gemessen und dann in regelmäßigen Zeitabständen überprüft. Die Gas-Durchflußrate (Df) wurde mit Gleichung 1 berechnet. Dazu wurden die Öffnungsimpulse für das gaseinlassende Magnetventil $(t_{I1} - t_{Io})$ aus der Aufzeichnung des pO_2-Wertes entnommen. Die Durchflußrate durch das geöffnete Magnetventil

(Df_{MV}) wurde mit Differenzdruckregler am Begasungsstand (Kap. III C5) eingestellt und der eingestellte Wert öfters überprüft. Mit diesen Werten wurde dann für Bereiche mit gleicher Magnetventil-Durchflußrate die durchschnittliche Gasdurchflußrate der Anlage (Ø Df) wie folgt berechnet:

$$\text{Ø Df} = \frac{\Sigma\left(t_{I1}-t_{Io}\right)\cdot t_I \cdot Df_{MV}}{(t_1 - t_o)\cdot 6o} \left[\frac{ml}{min}\right] \quad (1)$$

$\Sigma . t_{I1}-t_{Io}$ = Summe der Öffnungsimpulse des Magnetventils im Meß-Zeitraum $t_1 - t_o$.

t_I = Öffnungszeit des Magnetventils pro Impuls [min].

Df_{MV} = Durchflußrate durch das geöffnete Magnetventil $[ml \cdot min^{-1}]$

t_o = Anfang des Meß-Zeitraumes [h]

t_1 = Ende des Meß-Zeitraumes [h]

Berechnung der Sauerstoffverbrauchsrate

Die Meßwerte der 1. Ausbaustufe ermöglichten nur die Berechnung einer relativen Sauerstoffverbrauchsrate. Die absolute Sauerstoffverbrauchsrate wurde mit den Meßwerten der 2. Ausbaustufe bestimmt, da hier auch die Kohlendioxydabgabe durch die Bakterienkultur erfaßt wurde. Damit konnte die durch CO_2-Anreicherung der Abluft verursachte scheinbare O_2-Konzentrationsveränderung der Zuluft korrigiert werden: Wird ein Sauerstoffanteil der Zuluft im äquimolaren Verhältnis durch Kohlendioxyd ersetzt, so ergibt sich aus dem unterschiedlichen Molvolumen beider Gase (O_2 = 22,394 Nm^3/k Mol und CO_2 = 22,263 Nm^3/k Mol) eine Volumenänderung der gesamten Gasmenge; der Sauerstoffanteil der Abluft nimmt dadurch - im Vergleich zur Zuluft - ein größeres Volumen ein und die Sauerstoffkonzentration der Abluft verringert sich entsprechend. Dieser Fehler wurde mit Gleichung 2, in Anlehnung an PIRT & CALLOW (1958), korrigiert:

(2)

$$a_{1k} = \frac{a_1 \left[100 - (a_2 + b_2 - b_1) \right]}{100 - a_1} \; [\,\%\,]$$

a_{1k} = O_2 - Konzentration der Zuluft, korrigiert [%]
a_1 = O_2 - Konzentration der Zuluft [%]
a_2 = O_2 - Konzentration der Abluft [%]
b_1 = CO_2 - Konzentration der Zuluft [%]
b_2 = CO_2 - Konzentration der Abluft [%]

Der Ausdruck $(a_2 + b_2 - b_1)$ in Gleichung 2 fand nur bei CO_2-Konzentrationen der Zuluft $> 0{,}1$ % Anwendung; bei Konzentrationen $< 0{,}1$ % wurde dieser Ausdruck durch $a_2 + b_2$ ersetzt.

Die Sauerstoffverbrauchsrate (vO_2) der Bakterienkultur wurde mit der Beziehung

(3)

$$vO_2 = \frac{(a_{1k} - a_2) \cdot Df \cdot 273 \cdot 10^6}{100 \cdot V_G \cdot T_D \cdot 22{,}39} \; [\,nmole \cdot min^{-1} \cdot ml^{-1}\,]$$

nach HAMILTON & HOLMES (1970) berechnet.

Df = Durchflußrate der Abluft [$ml \cdot min^{-1}$]
V_G = Flüssigkeitsvolumen im Fermentergefäß [ml]
T_D^G = Temperatur der Abluft am Durchflußmesser [^oK]

Gleichung 2 und 3 wurden zur Berechnung der Sauerstoffverbrauchsrate mit den Meßwerten der O_2-Meß- und Regelanlage, 2. Ausbaustufe verwendet.

Standen nur Meßwerte der 1. Ausbaustufe zur Verfügung, so wurde die Berechnung der vO_2 mit Gleichung 1 und 3 durchgeführt. In Gleichung 3 wurde dann der Ausdruck "$(a_{1k} - a_2) \cdot Df$" durch "$(a_1 - a_2) \cdot \emptyset\, Df$" ersetzt.

E. Herstellung zellfreier Extrakte

Die Zellen wurden am Ende der exponentiellen Wachstumsphase mit einer Cepa Durchlaufzentrifuge (Carl Padberg, Lahr/Baden) mit Wasserkühlung oder vorzugsweise mit einem Szent-Gyorgi & Bluhm Durchlauferntesystem an einer RC2-B Sorvall Zentrifuge geerntet.

Dann wurden die Zellen zweimal mit eiskaltem 0,05 M Phosphatpuffer (pH 6,6) gewaschen und je 10 g Feuchtgewicht in 20 ml des gleichen Puffers suspendiert. Bis zur weiteren Aufarbeitung wurde diese Zellsuspension bei -20°C in Polyäthylenflaschen aufbewahrt.

Die Herstellung zellfreier Extrakte erfolgte nach dem Auftauen durch Beschallen mit einem 100 W/20 KHz Ultraschallgerät der Fa.MSE, London oder einem 250 W/20 KHz Ultraschallgerät der Fa.Schoeller, Frankfurt/M. Das 250 W Gerät wurde vorzugsweise zur Desintegration der sehr widerstandsfähigen Zellen von Rp. acidophila verwendet, die Temperatur der Suspension wurde durch Alkoholkühlung der Doppelwandgefäße mit einem Ultra-Kryomaten TK30D (Meßgerätewerk Lauda) knapp über dem Gefrierpunkt gehalten. Zur Vermeidung von hohen Temperaturen an der

Flüssigkeitszone am Beschallungsvorsatz wurde die Beschallung nach jeweils 10 sec für die gleiche Zeit unterbrochen. Die für einen 90 % Aufschluß erforderliche Beschalldauer betrug bei Rp. acidophila 8 sec/ml und bei den Rhodospirillen 4 sec/ml. Anschließend wurden die gröberen Zellbruchstücke und ganze Zellen durch 10 min Zentrifugation bei 10.000 × g und 2 - 3°C in einer MSE Superspeed 40 Zentrifuge vom Extrakt abgetrennt. Dieser Rohextrakt wurde durch differentielle Zentrifugation (Kap.V) mit einer MSE Superspeed 50 Zentrifuge in einem klaren Überstand und eine das photosynthetische Membransystem enthaltende schwere Fraktion (Chromatophoren-Fragment enthaltende Fraktion, vergl. KAMEN 1963) aufgetrennt.

F. Proteinbestimmung zellfreier Extrakte

Es wurden zwei Verfahren angewendet: 1. die unter D 2. beschriebene Gesamtstickstoffbestimmung nach Kjeldahl und 2. zur schnellen Proteinbestimmung die Biuretmethode nach BEISENHERZ et al. (1953), modifiziert.

Biuretmethode:

Reagenz: In 400 ml 0,2 N NaOH wurden 9 g K-Na-Tartrat, 3 g $CuSO_4 \cdot 5\ H_2O$ und 5 g Kaliumjodid gelöst und mit 0,2 N NaOH auf 1000 ml aufgefüllt. Die Proben mit 1 - 6 ml Protein wurden mit Aqua dest. auf ein Volumen von 0,85 ml gebracht und stark carotinoidhaltige Proben vor der Proteinbestimmung mit einem Methanol-Aceton-Gemisch (2 : 7) 15 min extrahiert. Anschließend wurde 5 min. bei 4000 × g zentrifugiert und das Sediment in 0,85 ml Aqua dest. aufgenommen. Die Proben wurden jetzt mit 0,15 ml 3 M Trichloressigsäure versetzt und das ausgefällte Protein durch 5 min Zentrifugation bei 4.000 g abgetrennt. Der Eiweißniederschlag wurde dann in etwa 4 ml Aqua dest. suspendiert, mit 5 ml Reagenz versetzt,

vermischt und auf 10 ml mit Aqua dest. aufgefüllt. Nach 30 min wurde die Extinktion bei 546 nm mit dem Zeiss Spektralphotometer PMQ II gegen einen Blindwert bestimmt. Der Proteingehalt des Ansatzes ließ sich dann aus einer für jeden Reagenz-Ansatz neu erstellten RSA-Eichkurve ablesen.

G. Bestimmung der Atmungs- und Enzymaktivitäten

Die Atmungsaktivitäten ganzer Zellen wurden mit manometrischen und polarographischen Methoden bestimmt. Bei schwach gefärbten zellfreien Extrakten wurden spektralphotometrische Methoden verwendet.

G 1. Spektralphotometrische Methoden

Die optische Bestimmung von Enzymaktivitäten wurde bei 25°C mit einem Zeiss Spektralphotometer PMQ II mit Temperierung des Küvettenhalters durch einen Lauda K2RD Thermostaten und einen BD8 Kompensationsschreiber (Fa.Kipp u.Zonen, Delft) durchgeführt. Abhängig vom Trübungsgrad der zellfreien Extrakte wurden Küvetten mit 1 oder 0,5 cm Schichtstärke aus optischem Spezialglas verwendet. Die Bestandteile der Bestimmungsansätze wurden in der angegebenen Reihenfolge zusammengegeben und in Abhängigkeit von der zu erwartenden spezifischen Aktivität unterschiedliche Mengen des zellfreien Extraktes zugegeben; auf das angegebene Volumen wurde mit aqua dest. aufgefüllt.

Vor Beginn einer Versuchsreihe mit zellfreien Extrakten aus einem neuen Aufschluß wurde der proportionale Wirkungsbereich des Enzyms festgestellt und dann die Versuche in diesem Bereich durchgeführt. Jeder Versuch wurde nach Möglichkeit dreimal wiederholt und die Mittelwerte zur Auswertung verwendet. Vor dem Einsatz von Chemikalien einer neuen Charge wurden die Leerwerte der Versuchsansätze neu bestimmt. Bei allen Versuchs-

ansätzen wurden die Küvetten 3 min vor Reaktionsbeginn temperiert.

a) NADH-Oxidase

Ansatz: Gesamtvolumen 1,0 ml
0,15 ml Phosphatpuffer 0,5 M * (75 mM)
Aqua dest. ad 1 ml
zellfreier Extrakt
0,02 ml NADH 10 µmole/ml (0,2 mM)

Es wurde die Extinktionsabnahme bei 340 nm gemessen. Reaktionsbeginn durch Zugabe des NADH. Die NADH-Lösung wurde täglich, durch Verdünnung einer Stammlösung mit 100 µmole NADH/ml in 0,05 M Phosphatpuffer pH 7,0, neu angesetzt.

*pH-Wert entsprechend dem pH-Optimum (Kap.V)

Berechnung: Molarer Extinktionskoeffizient für NADH von SIEGEL et al. (1959) = $6,2 \cdot 10^6$ cm^2/Mol.

b) NADH-Cytochrom c Reduktase (EC 1.6.99.3)

Ansatz: Gesamtvolumen 1,0 ml
0,15 ml Phosphatpuffer 0,5 M, pH 7,0 (150 mM)
Aqua dest. ad 1,0 ml Endvolumen
0,02 ml KCl, 1,0 M (20 mM)
0,01 ml Cytochrom c 10 µmole/ml (0,1 mM)
zellfreier Extrakt
0,04 ml NADH, 10 µmole/ml (0,4 mM)

Die Versuche fanden unter anaeroben Bedingungen statt. Gemessen wurde die Extinktionszunahme von Cytochrom c bei 546 nm gegen einen Blindwert ohne Cytochrom c; Reaktionsbeginn durch Zugabe des täglich frisch verdünnten NADH. Der Versuch wurde in Mikrotrogküvetten mit gasdichten Teflonstopfen durchgeführt und der Ansatz vor Reaktionsbeginn 4 min mit wasserdampfgesättigtem, sauerstofffreiem Stickstoff begast. Stickstoff "spezial" wurde zur Entfernung des Sauerstoffs über eine Sauerstoffabsorptionseinheit (Oxisorb, Fa.Messer, Griesheim) geschickt.

Berechnung: Millimolarer Extinktionskoeffizient für Cytochrom c aus Pferdeherz bei 550 nm von MASSEY (1959)
$= 2{,}1 \cdot 10^4 cm^2/mMol$

c) Cytochrom c-Oxidase (EC 1.9.3.1)

nach SASAKI et al. (1970) ergänzt.

Ansatz: Gesamtvolumen 1,0 ml
0,15 ml Phosphatpuffer 0,5 M, pH 7,5 (150 mM)
0,03 ml Cytochrom c reduziert,
0,5 µmole/ml (15 µM)
Aqua dest. ad 1,0 ml Endvolumen
zellfreier Extrakt

Es wurde die Extinktionsabnahme bei 550 nm gegen einen Blindwert ohne Cytochrom c gemessen. Reaktionsbeginn durch Zugabe des zellfreien Extraktes.

Zur Zubereitung des reduzierten Cytochrom c aus Pferdeherz wurden 4 ml Cytochrom c mit 1 µmole/ml in 0,1 M Phosphatpuffer pH 7,0 2mal 10 h gegen jeweils 500 ml des gleichen Puffers in einem Dialysierschlauch (Visking, Type 8/32) bei 5°C dialysiert.

Berechnung: siehe NADH-Cytochrom c-Reduktase

G 2. Manometrische Methoden

Gaswechsel-Messungen wurden mit einer Rund-Warburg-Apparatur (Braun, Melsungen, Typ V 166) und bei Beleuchtung mit einer Warburg-Apparatur mit kastenförmigem Aufsatz (Fa. Braun, Melsungen, Typ P 166 L) nach den von UMBREIT et al. (1964) beschriebenen Richtlinien durchgeführt. Die Versuchstemperatur betrug 30°C und die Schüttelfrequenz 120 Anschläge/min bei

einer Amplitude von 4 cm. Der Versuchsanordnung entsprechend wurden ein- oder zweiarmige Standardgefäße mit einem Volumen von 13 - 14 ml verwendet. Der Bereich der proportionalen Sauerstoffaufnahme wurde in Vorversuchen ermittelt und dann die entsprechenden Mengen Zellsuspension oder zellfreier Extrakt eingesetzt.

a) NADH-Oxidase

Gesamtvolumen 2,0 ml
Hauptraum: 0,3 ml Glycylglycin - Puffer 0,5 M
pH-Wert entsprechend dem pH-Optimum
Aqua dest. ad 2,0 ml Endvolumen
zellfreier Extrakt mit ca. 3,0 mg Protein

Zentralzylinder: 0,2 ml 10 % (w/v) NaOH
Seitenarm: 0,2 ml NADH 100 µmole/ml

Reaktionsbeginn durch Zugabe des NADH nach Konstanz der endogenen Atmung nach durchschnittlich 20 min. Die Gasdruckänderungen wurden in jeweils drei Parallelansätzen während 90 min erfaßt.

b) Succinat-Oxidase

Gesamtvolumen: 2,0 ml
Hauptraum: 0,3 ml Glycylglycin-Puffer
0,5 M, pH 7,4
Aqua dest. ad 2,0 ml Gesamtvolumen
zellfreier Extrakt, Membranfraktion
Zentralzylinder: 0,2 ml NaOH 10 % (w/v)
Seitenarm: 0,25 ml Na-Succinatlösung
100 µmole/ml

Messung wie bei der NADH- Oxidase

c) Atmungsaktivitäten

Die Sauerstoffaufnahme wurde wie bei dem Succinat-Oxidase-Versuchsansatz gemessen. Es wurde das jeweils zur Anzucht der Zellen verwendete Substrat eingesetzt. Die Zellen wurden

am gleichen Tag geerntet, 2 mal mit 0,05 M Phosphatpuffer (pH-Wert des Anzuchtmediums) gewaschen und in dem gleichen Puffer so suspendiert, daß sie etwa 10 - 15 mg Protein/ml enthielten; die endogene Atmung wurde jeweils in drei Parallelansätzen ohne Substrat verfolgt.

d) Beleuchtung bei manometrischen Messungen

Die Warburg-Apparatur mit kastenförmigem Aufsatz wurde mit 6 Punktstrahlern von 100 W (Radium E 27) versehen und die Wasserkühlung bei eingeschalteter Beleuchtung so reguliert, daß die Heiz- und Kühlintervalle der Temperiereinrichtung sich in gleichmäßigen Intervallen abwechselten. Zusätzlich zur normalen Temperiereinrichtung wurde zur Erhöhung der Temperaturkonstanz ein Einhängethermostat ("Thermomix-Standard", Fa.Braun, Melsungen) im Wasserbad angebracht.
Der Gasstoffwechsel wurde jeweils in drei mit Aluminium-Folie abgedunkelten und drei nicht abgedunkelten Parallelansätzen verfolgt.

c) Begasung bei manometrischen Messungen

Gasmischungen wurden in kalibrierten, mit Kupfersulfatlösung gefüllten Niveauflaschen hergestellt. Zur Einstellung des Gasgleichgewichtes zwischen der Kupfersulfatlösung und dem Gasraum wurden die Niveauflaschen vor Benutzung dreimal mit dem entsprechenden Gasgemisch gespült.

Die Gasverteilungsvorrichtung wurde 5 min vor Versuchsbeginn mit der Gasmischung durchströmt und anschließend die an die Manometer angeschlossenen Gefäße 10 min unter Schütteln mit dem Gas durchströmt und dann die Schornsteine geschlossen.

G 3. Polarographische Methoden

Der Sauerstoffverbrauch wurde mit einer Sauerstoffelektrode vom Clark-Typ(CLARK 1956) in einer von LESSLER et al. (1966) beschriebenen Sauerstoffmeßeinheit der Fa. Yellow Springs

Instrument Co., Ohio (Modell 53) gemessen. Die Temperierung der Küvetten erfolgte mit einem Thermostaten (Type FE, Fa. Haake, Berlin) mit angeschlossener Wasserkühlung. Die Aufzeichnung der Ergebnisse erfolgte mit einem Kompensationsschreiber Servogor - RE 511 (Fa.Metrawatt, Nürnberg). Die Küvetten und der Plexiglashalter der Sauerstoffelektrode wurden zur Abtötung von Keimen 2 mal wöchentlich für 15 min in 70 % Äthanol gelegt. Wegen der Empfindlichkeit der Methode wurden sämtliche Ansätze mit sterilem aqua dest. und sterilen Pufferlösungen hergestellt. Die Elektrode wurde mehrmals täglich mit luftgesättigtem sterilem Wasser geeicht und während längerer Meßpausen im unpolarisierten Zustand in dem Luftraum einer zur Hälfte mit aqua dest. gefüllten Küvette aufbewahrt.

Sämtliche Versuche wurden bei 30°C durchgeführt und die Ansätze 3 min vor Reaktionsbeginn in der Küvette temperiert. Das für die Versuchsansätze benötigte sterile aqua dest. wurde täglich vor Versuchsbeginn durch starkes Rühren mit einem Magnetrührer luftgesättigt.

Berechnung:

1 ml luftgesättigtes H_2O enthält nach TRUESDALE et al.(1955) bei 30°C und 760 Torr 7,53 µg O_2/ml. Da der Salzgehalt der Versuchsansätze < 0,1 % war, ist der Fehler durch diesen relativ klein und wurde nicht berücksichtigt.

$$\Delta_{O_2} = \Delta S^{t}_{O_2} \cdot \left(\frac{O^{T}_{2\ Lsg.} \cdot P_B \cdot V_{Fl} \cdot 10^9}{MG_{O_2} \cdot 100 \cdot 760 \cdot \Sigma Prot} \right) [nmole\ O_2 \cdot min^{-1} \cdot mgProt] \qquad (4)$$

Δ_{O_2} = Sauerstoffverbrauch während der Reaktion

$\Delta S^{t}_{O_2}$ = Messwert-Abnahme der O_2-Sättigung im Reaktionsgefäß $\left[Skalenteile\left(\frac{1}{100}\right) \cdot min^{-1} \right]$

$O^{T}_{2Lsg.}$ = Gelöster Sauerstoff in sauerstoffgesättigtem Wasser zu Beginn des Versuches bei der Versuchstemperatur [µg/ml]

P_B = Barometrischer Luftdruck zu Versuchsbeginn [Torr]

V_{F1} = Flüssigkeitsvolumen des Ansatzes [ml]

MG_{O_2} = Molekulargewicht von Sauerstoff [µg]

$\sum$ Prot = Gesamte Proteinmenge des Zellextraktes im Versuchsansatz [mg]

Die Ansätze wurden in Abhängigkeit von der zur Verfügung stehenden Zellextraktmenge mit 2 oder 3 ml Flüssigkeitsvolumen (V_{F1}) gefahren; die Konzentrationen der Bestandteile des Ansatzes wurden durch entsprechende quantitative Änderungen konstant gehalten. Bei Ansätzen mit 2 ml Flüssigkeitsvolumen traten leichte Beschädigungen der Elektrodenmembran auf.

Der Reaktionsverlauf wurde während 5 - 10 min gemessen.

a) NADH-Oxidase

Ansatz: Gesamtvolumen 3,0 ml
0,3 ml Phosphatpuffer 0,5 M* (50 mM)
Aqua dest. ad 3,0 ml Gesamtvolumen
Zellfreier Extrakt
0,1 ml NADH 100 µmole/ml (3,3 mM)

Reaktionsbeginn durch Zugabe des NADH
*pH-Wert entsprechend dem pH-Optimum, siehe Kap.V

b) Succinat-Oxidase

Ansatz: Gesamtvolumen 3,0 ml
0,3 ml Phosphatpuffer 0,5 M, pH 7,5 (50 mM)
Aqua dest. ad 3,0 ml Gesamtvolumen
Zellfreier Extrakt
0,03 ml Na-Succinat 1000 µmole/ml (10 mM)

Reaktionsbeginn durch Zugabe des Na-Succinats

c) Cytochrom c - Oxidase (EC 1.9.3.1)

Ansatz: Gesamtvolumen 3,0 ml

0,3 ml Phosphatpuffer 0,5 M, pH 7,0	(50 mM)
Aqua dest. ad 3,0 ml Gesamtvolumen	
0,05 ml $MgCl_2$, 0,5 M	(8,3 mM)
Zellfreier Extrakt	
0,15 ml Ascorbat 200 µmole/ml, pH 7,0	(10 mM)
0,04 ml Cyt.c, 10 µmole/ml	(0,166 mM)

Reaktionsbeginn durch Zugabe der täglich frisch angesetzten Ascorbatlösung. Die Autoxidation von Ascorbat wurde für verschiedene Pufferarten, pH-Werte und bei unterschiedlichen Temperaturen festgestellt; die deutliche Erhöhung der Autoxidation bei pH-Werten $>$7,0 erforderte beim Zusatz stark alkalischer Hemmstoffe eine Erhöhung der Pufferkonzentration auf 100 mM.

H. Cytochrombestimmung nach KLEMME u. SCHLEGEL (1969), verändert

Cytochrome vom b-Typ wurden als Aceton-HCl lösliches und vom c-Typ als Aceton-HCl unlösliches Hämin bestimmt. Die Cytochrombestimmung wurde mit ganzen Zellen und zellfreien Extrakten durchgeführt. Für jede Bestimmung waren 20 - 30 mg Protein erforderlich; bei ganzen Zellen wurden die gewaschenen Zellen in physiologischer Kochsalzlösung (9 g NaCl in 1000 ml Aqua dest.) so suspendiert, daß der Proteingehalt 20 - 30 mg/ml erreichte. Die Zellsuspension oder der zellfreie Extrakt wurde zur Entfernung des BChl und der Carotinoide mit 9 ml Aceton/Methanol 7 : 2 versetzt, gut durchgeschüttelt, 15 min bei Zimmertemperatur extrahiert und 15 min bei 10.000 zentrifugiert und der Überstand verworfen; die Extraktion wurde bis zur Entfärbung des Sediments wiederholt. Die nun folgenden Arbeitsschritte wurden bei ca. 3°C ausgeführt: Das Sediment wurde in 2 ml Aceton-HCl

(4 Teile Aceton + 1 Teil 0,05 N HCl) suspendiert, 10 min in einem verschlossenen Zentrifugenröhrchen extrahiert und anschließend 15 min bei 10.000×g zentrifugiert. Der Überstand wurde mit 2 ml Pyridin-NaOH (25 % v/v in 0,1 N NaOH) versetzt (= Überstand I) und in einem verschlossenen Zentrifugenröhrchen in Eis aufbewahrt; das Sediment wurde in 4 ml Pyridin-NaOH (bei 20 mg Protein/ml in der Ausgangssubstanz nur 2 ml) suspendiert, 15 min in einem verschlossenen Zentrifugenröhrchen extrahiert und 30 min bei 30.000×g zentrifugiert; das Sediment wurde verworfen und der Überstand (= Überstand II) in Eis aufbewahrt.
Am gleichen Tag wurden dann die Pyridinhämochrome im Überstand I und II im Differenzspektrum (Natriumdithionit reduziert minus Luft oxydiert) gemessen. Im Überstand I mit den Aceton-HCl-löslichen Häminen befanden sich die Cytochrome vom a- und b-Typ und im Überstand II mit den Aceton-HCl unlöslichen Häminen die Cytochrome vom c-Typ.
Die Differenzspektren wurden im Bereich von 350 bis 800 nm mit einem Zeiss DMR 21 Zweistrahlspektralphotometer bei Zimmertemperatur aufgenommen. Es wurden je nach Farbintensität der Überstände I und II Mikrotrogküvetten aus optischem Spezialglas mit 0,5 oder 1,0 cm Schichtstärke verwendet. Der Extrakt in der Küvette wurde 3 min vor der Aufnahme des Differenzspektrums mit einigen Körnchen Na-Dithionit versetzt und der Inhalt vermischt.

I. Chemikalien

Es wurden p.a. Chemikalien der Fa.Merck, Darmstadt verwendet.
Die speziellen Chemikalien und Biochemikalien lieferten die folgenden Firmen: Fa.Bayer A.G., Leverkusen: Lipase, Silikonöl/Bayer
Fa.Boehringer Mannheim GmbH, Mannheim: Antimycin A, Cytochrom c, Desoxyribonuclease, FMN, NAD, NADH, NADPH.
Fa. Calbiochem, Los Angeles (USA): CCCP, Cytochrom c (Candida krusei)

Fa.Difco Laboratories, Detroit (USA): Agar, AC-Medium, Hefeextrakt.
Fa.Fluka A.G., Buchs (Schweiz): Glycylglycin, di-Natriumsuccinat, Natriumthioglycolat, Polypropylenglycol.

Fa.Pharmacia, Uppsala (Schweden): Sephadex G-25.
Fa.Serva, Heidelberg: Phenazin-Methosulfat.
Fa.Sigma Chemical Co., St.Louis, Mo. (USA): Coenzym-Q_{10}, HQNO.
Fa. The British Drug Houses Ltd., Poole, England: Rotenon, Amytal.
Herr Dr.K.H.Büchel, Bayer Forschungszentrum, Wuppertal-Elberfeld, stellte freundlicherweise TTFB zur Verfügung.

III. ENTWICKLUNG UND BETRIEB EINES FERMENTERS

Voraussetzungen

Die Anzucht phototropher Bakterien anaerob im Licht erfordert eine allseitige Beleuchtung des Anzuchtgefäßes durch eine Lichtquelle mit einer Lichtemission im geeigneten Wellenlängenbereich. Zur ausreichenden Beleuchtung bei unterschiedlichen Zelldichten sollte die Beleuchtungsstärke kontinuierlich veränderbar sein und das Gefäß so dimensioniert sein, daß die beleuchtete Oberfläche im Vergleich zum Volumen groß ist. Bei phototrophem und chemoorganotrophem Wachstum ist eine Begasung der Kulturen erforderlich, ein konstanter Sauerstoffpartialdruck (pO_2) sollte auch im unteren Bereich aufrecht erhalten werden. Unter mikroaeroben Wachstumsbedingungen ist mit Verdopplungszeiten von 60 h zu rechnen, und zur Einstellung eines vom pO_2 abhängigen BChl-Gehaltes werden mehrere Generationen benötigt; daher sollte der Fermenter Kontaminationen bei einem mehrwöchigen Lauf ausschließen. Längere Wachstumsversuche erfordern Entleerungen und Auffüllungen des Fermentergefäßes ohne Kontamination, sowie eine sterile Zugabe von Nährsubstraten und pH-Korrekturmittel. Sterile Probenahmen sollten leicht durchführbar sein. Die kommerziell erhältlichen Labor-Fermenter erfüllten diese Ansprüche nur ungenügend; die Mehrzahl der Fabrikate hatte ein teilweise von Armaturen und Antrieb umbautes Fermentergefäß, was eine allseitige Beleuchtung unmöglich machte, oder eine vom Antrieb verbaute Kopfplatte, welche den Einsatz von Elektroden und Sonden erschwerte. Eine Beleuchtungsanlage mit Glühlampenlicht, wie sie für phototrophe Bakterien benötigt wird, war im Handel nicht erhältlich. Es wurde daher ein geeigneter Fermenter mit Beleuchtungsanlage in Zusammenarbeit mit der Fa.H.Jungkeit, Mess- und Regeltechnik, 3411 Angerstein, entwickelt.

A. Gesamter Fermenter-Aufbau

A 1. Technische Konzeption

In Vorversuchen mit einem 20 l Quickfitt-Glaskolben der Fa.Jobling, Stone (Straffordshire) mit Schliffanschlüssen und Rührung mittels Magnetrührer erwies sich vor allem die Beleuchtung mit Glühlampen als problematisch. Eine ausreichende, das Wachstum nicht begrenzende Beleuchtungsstärke war ohne stärkeren Temperaturanstieg im Fermenter nicht zu erreichen. Der neu konzipierte Fermenter sollte ein freistehendes Gefäß und eine Beleuchtungsanlage mit eigener Wärmeabführung aufweisen.

Chemoorganotrophes Wachstum wurde im Glaskolben durch die Sauerstoffzuführung begrenzt. Eine Erhöhung der Begasungsrate führte zu übermäßiger Schaumentwicklung mit entsprechender Befeuchtung des Abluftfilters. Das Fermenterkonzept sollte daher die Möglichkeit einer mechanischen und chemischen Schaumbekämpfung vorsehen.

Um eine Kontamination über die Rührwellendurchführung auszuschließen, sollte der Antrieb der Rührwelle über eine Magnetkupplung von der Bodenplatte aus erfolgen.

In Abb.III 1a und 1b ist die fertiggestellte Fermenteranlage dargestellt. Der Wärmeaustauscher zur Kühlung der Beleuchtungsanlage (Abb.III 1/11) und der Transformator zur Regelung der Beleuchtungsstärke befinden sich außerhalb des Raumes. Die Gasflaschen für die Begasungsanlage sind in der Abbildung nicht sichtbar. Alle Kontroll- und Meßinstrumente wurden nach dem Baukastenprinzip konzipiert und getrennt vom Fermentergefäß z.T. in dem fahrbaren Schrank (Abb.III 1/2-7) untergebracht.

Erläuterung zur Abb.III 1b

1) Paramagnetischer O_2-Analysator
2) Schalteinheit (ratio box) für O_2-Analysator
3) Punktdrucker
4) Steuereinheit zur Temperatur- und Drehzahlregelung
5) Steuereinheit zur pH-Regelung
6) CO_2-Analysator
7) Gasmischstand
8) Kühlgefäß
9) Säurebehälter
10) Schlauchpumpe zur pH-Steuerung
11) Beleuchtungsanlage
12) Fermentergefäß
13) Probenehmer
14) Abluftfilter
15) Abluftkondensator
16) Thermischer Durchflußmesser
17) Gasuhr
18) Motor-Nadelventil (Zuluft)
19) Gasblasenfänger (kontinuierliche Trübungsmessung)
20) Schlauchpumpe (kontinuierliche Trübungsmessung)
21) Photometer (kontinuierliche Trübungsmessung)
22) Transmissions-Extinktions-Wandler
23) Flachschreiber
24) pO_2-Regler (sterilisierbare Elektrode)
25) pO_2-Regler (nicht sterilisierbare Elektrode)
26) Spannungskonstanthalter
27) Thyristorregler für Abluftfilterheizung

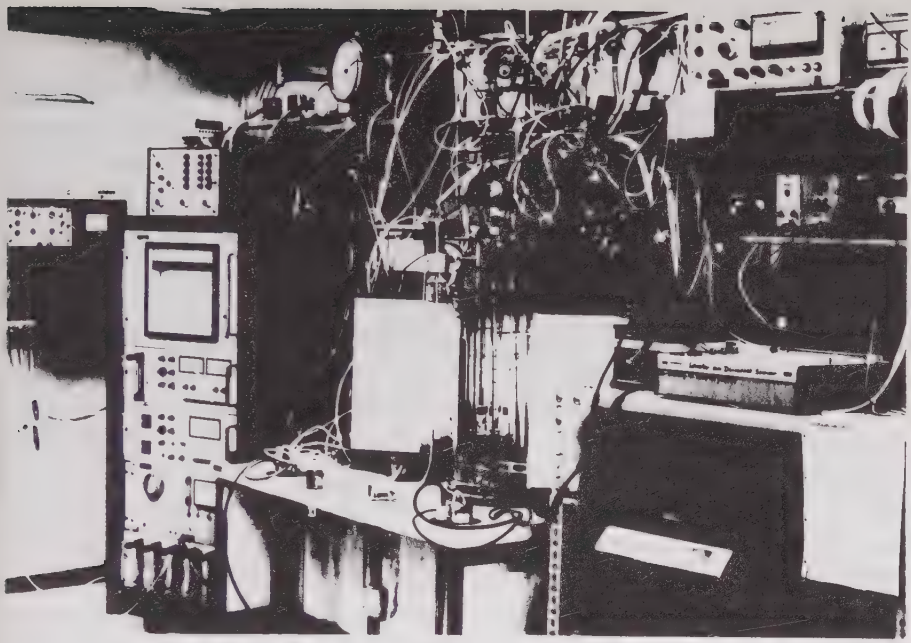


Abb.III 1a: Fermenteranlage mit eingeschalteter Beleuchtung

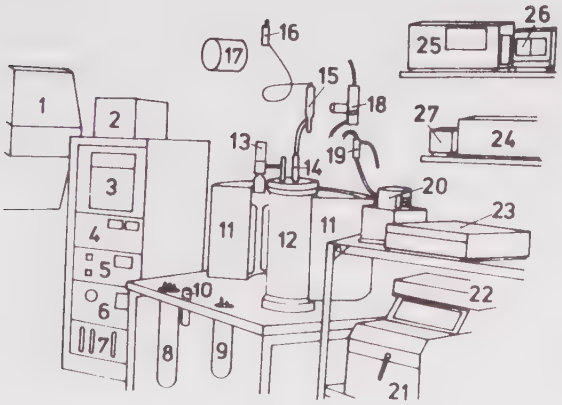


Abb.III 1b: Schematische Darstellung von Abb.III 1a
(Erläuterung gegenüber)

A 2. Fermentergefäß

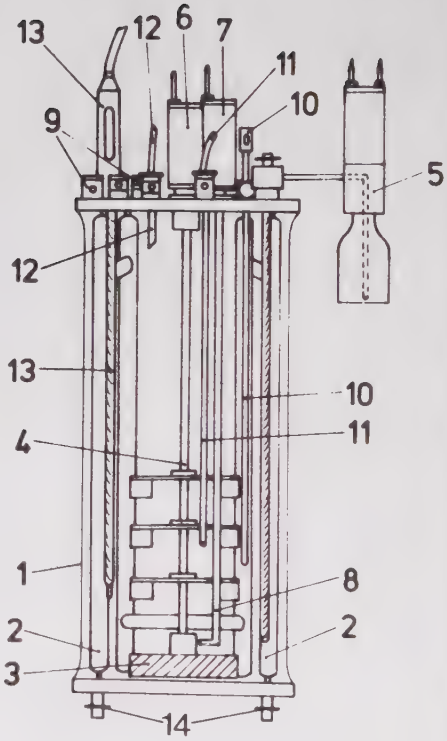
Das Gefäß(Abb.III 1/12)wurde nach dem Prinzip eines durch Kopf- und Bodenplatte abgedichteten aufrechtstehenden Glaszylinders gebaut(Abb.III 2/2).Der Zusammenhalt von Boden- und Kopfplatte erfolgte durch vier innenliegende, an der Bodenplatte angeschweißte und an der Kopfplatte verschraubte Rohre (Abb.III 2/2). Diese Rohre waren abgeflacht, so daß sie als Schikanen zur Durchmischung des Gefäßinhaltes dienten; sie waren untereinander verbunden und hatten an zwei Stellen, unterhalb der Bodenplatte, Öffnungen zum Ein- und Ausfluß von Temperierwasser (14). Die Kopfplatte wies 13 Bohrungen zur Anbringung von Universalstechanschlüssen auf (9). Hier wurden pH-Elektrode (13), pO_2-Elektrode, Temperaturfühler (10), Probenehmer (5) sowie Zuluft- und Abluftfilter (6,7) eingebaut. Die Zugabevorrichtung für das pH-Korrekturmittel und das geschlossene System zur kontinuierlichen Trübungsmessung (11,12) wurden ebenfalls hier angeschlossen. Die Begasung erfolgte über ein Begasungsrohr mit drei 0,5 mm starken Öffnungen unterhalb des ersten Rührblattes (8).

Sämtliche Metallteile wurden aus nichtrostendem Stahl, Werkstoff Nr. 1.4571 (Bezeichnung nach DIN 17006) angefertigt. Die Abdichtung erfolgte mit Dichtungsringen aus Viton. Ein dreiwöchiger Probelauf mit sterilem, nicht beimpftem, belüftetem Vollmedium zeigte keine Kontamination. Die Rührung erfolgte über eine durch Magnetkupplung angetriebene Welle (Abb.III 2/ 3 und 4).

Abb.III 3 zeigt die Rührvorrichtung mit Magnetkupplung und außen angebrachtem Antriebsmotor. Die Lagerung des Innenmagneten erwies sich als schwierig. Durch eine fertigungsbedingte Asymmetrie am Glaszylinder waren die Rührwellenlager an der Kopf- und Fußplatte nach der Montage des Gefäßes nicht konzentrisch; am unteren Gleitlager traten Reibungen auf, die einen starken Abrieb bewirkten. Kugellager aus Tantal, Werkstoff

Abb.III 2:
Fermentergefäß

1) Glaszylinder
2 Hohlschikanen zur Temperierung
3) Innenmagnet
4) Rührwelle mit Blattrührer
5) Probenahme-Beimpfungsvorrichtung
6) Abluftfilter
7) Zuluftfilter
8) Begasungsrohr
9) Universalstech-anschlüsse
10) Temperaturfühler
11) Entnahmerohr für kontinuierliche Trübungsmessung
12) Rückfluß für kontinuierliche Trübungsmessung
13) pH-Elektrode
14) Anschlußstutzen für den Temperierkreislauf



1.4401 und 1.4034 (Bezeichnung nach DIN 17006) korrodierten stark, so daß sich die Flüssigkeit im Fermentergefäß verfärbte. Eine bewegliche Kugelkopfbefestigung der Rührwelle am inneren Magneten reduzierte dann den Abrieb des Gleitlagers auf ein Minimum. Es wurden Probeläufe mit folgenden Gleitlagermaterialien gefahren: Teflon,Teflon-Glasfiber, Teflon-Kohle und kunstharzgetränkter Kohle. Der geringste Abrieb wurde mit Gleitlagern aus kunstharzgetränkter Kohle erreicht, Teflon verformte sich bei der Dampfsterilisation.

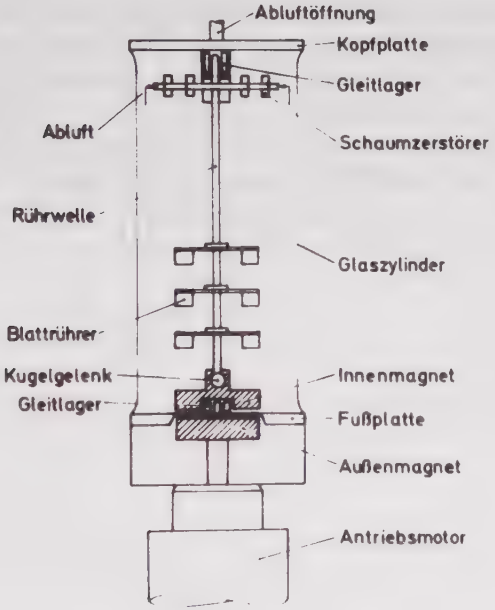


Abb.III 3: Rührvorrichtung des Fermentergefäßes

Der Antrieb der Rührvorrichtung erfolgt über eine Magnetkupplung. Der freiliegende, mit dem Antriebsmotor verbundene Außenmagnet überträgt das Drehmoment auf den Innenmagnet, der durch die Fußplatte aus rostfreiem Stahl vom Außenmagneten getrennt ist. Für Einzelheiten siehe Text.

Die Leistung des Belüftungssystems wurde durch Messung der Sauerstoffübergangsrate mit der Sulfitoxydationsmethode festgestellt. Mc DANIEL et al. (1965) fanden, daß die Sauerstoffübergangsrate im Sulfit-Bakterienkulturmedium in einem 50 l Fermenter bei niedrigen Rührgeschwindigkeiten (130 Upm) gleich der Sauerstoffübergangsrate einer wässrigen Sulfitlösung war; bei höherer Geschwindigkeit erreichte sie nur 70 - 80 % der in der wässrigen Sulfitlösung gemessenen Sauerstoffübergangsrate. Die Messungen wurden mit wässriger Sulfitlösung durchgeführt, da vergleichbare Werte von anderen Autoren nur mit dieser Methode vorliegen. In Abb.III 4 sind die Werte für die Sulfitoxydationsraten bei verschiedenen Rührgeschwindigkeiten aufgetragen; Tab. III 1 zeigt die daraus berechneten Sauerstoffübergangsraten. Eine Erhöhung der Rührgeschwindigkeit von 400 auf 600 Upm vergrößerte die Übergangsrate um den Faktor 2,7, eine Erhöhung von 600 auf 900 Upm aber nur um den Faktor 1,8. Tab. III 2 zeigt die Schaumbildungsrate in Abhängigkeit von der Rührdrehzahl. Der angebrachte einfache mechanische Schaumzerstörer hatte keine größere Effektivität bei höherer Rührgeschwindigkeit: Die Schaumbildungsrate stieg exponentiell mit der Rührdrehzahl an.

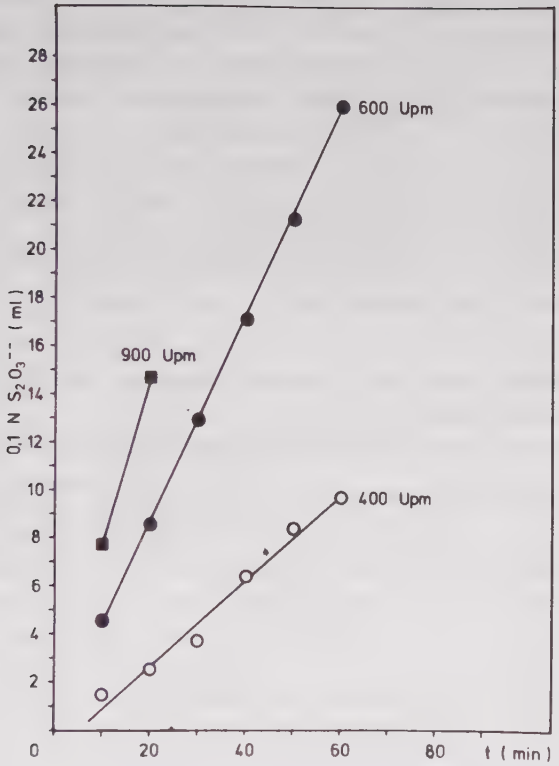


Abb.III 4: Abhängigkeit der Sulfitoxydationsrate im Fermenter von der Rührgeschwindigkeit

Versuchsbedingungen im Fermentergefäß: Füllvolumen 10 l, Temperatur 29°C und Belüftungsrate 40 l Luft/h. Messung der Sauerstoffübergangsrate mit Sulfitoxydationsmethode siehe Kap. II D 6. Probevolumen 5 ml.

Tab. III 1: Abhängigkeit der Sauerstoffübergangsrate von der Rührgeschwindigkeit

Rührgeschwindigkeit (Upm)	Sauerstoffübergangsrate (mmole O_2/l/h)
400	48
600	130
900	222

Die Werte wurden aus den Sulfitoxydationsraten in Abb.III 4 berechnet.

Tab. III 2: Abhängigkeit der Schaumbildung von der Rührgeschwindigkeit

Rührgeschwindigkeit (Upm)	Zeit des Schaumanstieges bis Abluftfilter (min)
200	10
300	5,23
400	2,75

Die Versuche wurden im Fermenter mit 10 l Nährlösung gefahren. NL: 0,25 % (w/v) Pepton 0,1 % (w/v) Hefeextrakt. Temperatur 29°C. Als Schaumabweiser wurde eine Blechscheibe kurz vor der Abluftöffnung an der Rührwelle angebracht.

Die Sauerstoffübergangsraten im neu entwickelten Fermenter sind mit den Werten anderer Fabrikate vergleichbar. Um zu einem Urteil zu gelangen, ob die Belüftung im Fermenter zur Sauerstoffversorgung von aerob wachsenden phototrophen Bakterien ausreicht, kann die Sauerstoffübergangsrate mit der Rate der O_2-Aufnahme dieser Bakterien verglichen werden. Die spezifische Rate der Sauerstoffaufnahme für Rp. acidophila mit Succinat als

Substrat betrug Q_{O_2} = 0,0036 mmole O_2/h/mg Protein; bei 600 Upm und einer Belüftungsrate von 40 l Luft/h hat der Fermenter eine Sauerstoffübergangsrate von 130 mmole O_2/h/l. Diese Übergangsrate ist ausreichend für eine Bakteriensuspension, die pro ml $\frac{0,130}{0,0036}$ = 35 mg Protein enthält. Berücksichtigt man die auf 70 % herabgesetzte Sauerstoffübergangsrate in der Bakteriennährlösung, so reicht die Sauerstoffversorgung für $\frac{35 \times 70}{100}$ = 24,5 mg Prot./ml aus; das entspricht einem Trockengewicht von 52 mg/ml. Im diskontinuierlichen Anzuchtsverfahren wurden Kulturen von Rp. acidophila nur bis zu einem maximalen Trockengewicht von 1,7 mg/ml, entsprechend 0,82 mg Prot./ml angezogen, so daß der Sauerstoff im Fermenter in keinem Fall in den Bereich wachstumsbegrenzender Konzentrationen geriet.

A 3. Probenahme-Beimpfungsvorrichtung

Abb. III 5 zeigt die Probenahme-Beimpfungsvorrichtung. Sie wurde in Anlehnung an die von HEATLEY (1950) beschriebene Probeentnahme gebaut. An die Vorrichtung konnten Flaschen mit standardisiertem Gewinde angeschlossen werden; zur Probeentnahme wurden sterile, leere Flaschen angeschraubt und zur Beimpfung die zur Anzucht der Vorkultur benutzten Flaschen. Die Probeentnahme erfolgte so, daß nach Durchblasen des Probeentnahmerohres (Abb.III 5/1) Vakuum an das Filter (3 u.4) angelegt wurde oder durch Überdruck im Fermentergefäß die Probenahmeflüssigkeit in die sterile Flasche floß. Die Entleerung des Fermentergefäßes wurde mit der in Abb.III 5/7 gezeigten, abgeänderten Flasche mit Bodenöffnung durchgeführt. Die Beimpfung des Fermenters erfolgte so, daß eine Flasche (6) mit Vorkultur am Probenehmer-Kopf (5) verschraubt wurde, um dann die Vorkultur mit Überdruck in das Fermentergefäß zu drücken. Anschließend wurde die Probenahmevorrichtung durch einen mehrmaligen Rückfluß und erneutes Zurückdrücken der beimpften Kulturflüssigkeit gespült und dann erst Proben zur Analyse entnommen. Dieser Vorgang wurde bei jeder Probeentnahme wiederholt.
Die Konstruktion des Probenehmerhahnes (2) war schwierig; ein dafür vorgesehener, glasfaserverstärkter Teflonkegel verformte

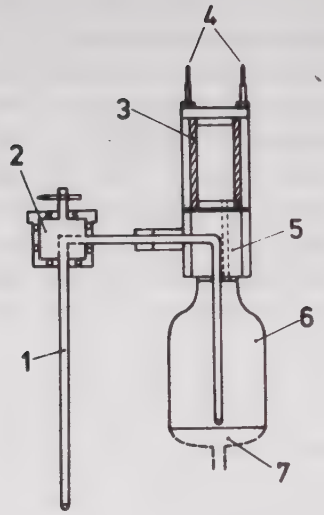


Abb. III 5: Probenahme-Beimpfungsvorrichtung

1) Probenahmerohr (im Fermentergefäß)
2) Probenahmehahn
3) Luft-Sterilfilter
4) Gasanschlüsse mit Steckkupplungen
5) Probenahmekopf mit Gewinde für Flaschen
6) Flasche mit Gewinde
7) abgeänderte Flasche mit Bodenöffnung zur Entleerung des Fermentergefäßes

sich beim Autoklavieren und war dann nur schwer zu öffnen. Der in Abb. III 5/2 dargestellte Hahn aus rostfreiem Stahl mit Viton-Dichtungsringen blieb absolut steril und veränderte sich auch nicht beim Autoklavieren.

A 4. Schaumbekämpfung

Es wurde der in Abb. III 3 dargestellte mechanische Schaumzerstörer entwickelt. Eine einfache Blechscheibe als Schaumabweiser konnte das Eindringen des Schaumes in den Abluftfilter (Abb.III 2/6) nicht verhindern (siehe Tabelle III 2). Bei höheren Zelldichten in belüfteten Kulturen konnte auch der hier gezeigte mechanische Schaumzerstörer den Schaum nicht beseitigen; die höhere Effektivität des Schaumzerstörers bei höherer Rührdrehzahl konnte nicht die durch die Rührvorrichtung verursachte Mehrproduktion an Schaum kompensieren. Die Zugabe chemischer Antischaummittel zum Fermenterinhalt erschien nicht zweckmäßig, da diese Stoffe teilweise durch Bakterien abgebaut werden können, bei der Ernte der Bakterienzellen nur schwer von diesen abtrennbar sind und die Sauerstoffübergangsrate herabsetzen (KÖNIG 1967). Der durch den Schaumzerstörer nicht abgefangene Schaum befeuchtete den Abluftfilter (Infektionsgefahr) und verursachte Schäden in den nachgeschalteten Abluft-Analysengeräten (Abb. III 1/1 u.6). Zur Zerstörung des Schaumes außerhalb des Fermentergefäßes wurde die in Abb. III 6 gezeigte externe chemische Schaumbekämfungsvorrichtung entwickelt. Die Abluft mit dem vom mechanischen Schaumzerstörer nicht abgefangenen Schaum durchperlte außerhalb des Fermentergefäßes eine Lösung mit Antischaummittel; der zerstörte Schaum verursachte eine Zunahme des Flüssigkeitsvolumens im Antischaumgefäß. Bei einem Fermenter-Arbeitsvolumen von 10 l und starker Schaumentwicklung wurde im Antischaumgefäß bis zu 1 l Flüssigkeit in 72 h abgefangen.

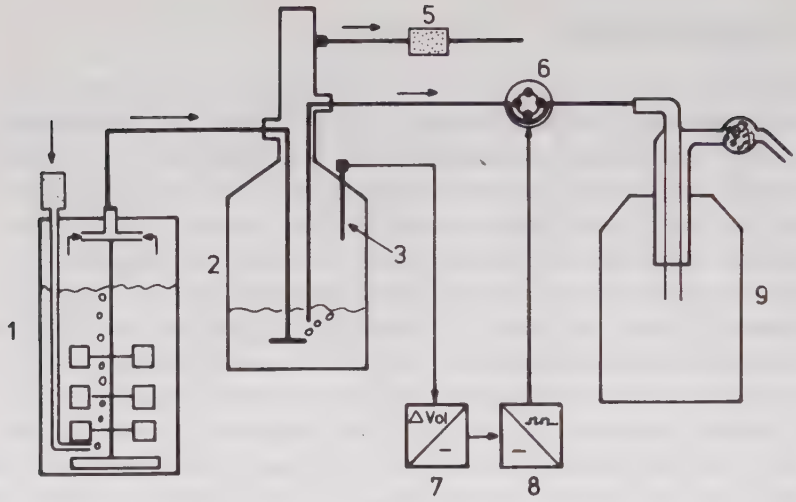


Abb. III 6: Externe chemische Schaumbekämpfung

Die Abluft entweicht durch den mechanischen Schaumzerstörer aus dem Fermentergefäß (1), durchperlt eine Antischaumlösung im Gefäß (2) [Gefäßvolumen 500 ml] und gelangt durch den Sterilfilter (5) in den unsterilen Raum. Steigt der Flüssigkeitsspiegel im Antischaumgefäß (2) bis zur Antischaumelektrode (3), so wird über einen Verstärker (7) und dem Arbeit/Pause - Impulsgeber (8) die Schlauchpumpe (6) in Betrieb genommen. Die Flüssigkeit im Antischaumgefäß (2) wird dann bis zu einem Niveau unterhalb der Elektrode (3) in das Auffanggefäß (9) abgepumpt.

B. Mess- und Regeltechnik

B 1. Temperatur

Die Temperierung der Kulturflüssigkeit im Fermentergefäß erfolgte über die als Wärmeaustauscher ausgebildeten Hohlschikanen (Abb. III 7/2). Der in Abb. III 7 dargestellte geschlossene Temperierwasserkreislauf (15) wurde außerhalb des Fermentergefäßes (12 u.14) auf eine Sollwert-Temperatur gebracht und diese dann in der Kulturflüssigkeit mit einem Widerstandsthermometer (3) Pt100 (Platin, 100 Ohm bei $0^{o}C$) gemessen. Bei Abweichungen von der Sollwerttemperatur wurden über den Temperatur-Meßumformer (4) und Temperaturregler (5) entsprechende Impulse (6) an das Kühlwasserventil (9) oder den Durchlauferhitzer (14) gegeben. Die Impuls-Pausenzeit konnte am Temperaturregler (5 u.6) eingestellt werden; bei starker Abweichung des Sollwertes von der Raumtemperatur waren Temperierimpulse von 4 - 5 sec und bei geringerer Abweichung Impulse von 1 - 2 sec ausreichend. Bei diesem Temperiersystem war eine Heizung des Temperierwassers mit Gegenkühlung nicht erforderlich und der Kühlwasserverbrauch entsprechend gering. Die Temperaturkonstanz in der Kulturflüssigkeit betrug $\pm$ $0,1^{o}C$. Zur Inbetriebnahme des Temperierwasserkreislaufes mußte nach Anschluß des Fermentergefäßes (16) das Temperierwasser (in 12) mit Druckluft in das Umlaufsystem (2 u.15) gepreßt werden. Dann besorgten die in Abb. III 7 (17) dargestellten Kreiselpumpen die Umwälzung. Vor der Abnahme des Fermentergefäßes von der Antriebseinheit wurde das Temperierwasser mit Druckluft aus den Hohlschikanen gepreßt.

B 2. pH-Regelung

Die pH-Regelung (Abb. III 8) umfaßte eine sterilisierbare kombinierte pH-Glaselektrode (2), einen pH-Meßumformer (3) mit Regler (4) und Pausen-Impulsgeber (5), Säure- und Lauge-Vorratsbehälter (10) und Schlauchpumpen (9). Abb. III 8 zeigt das

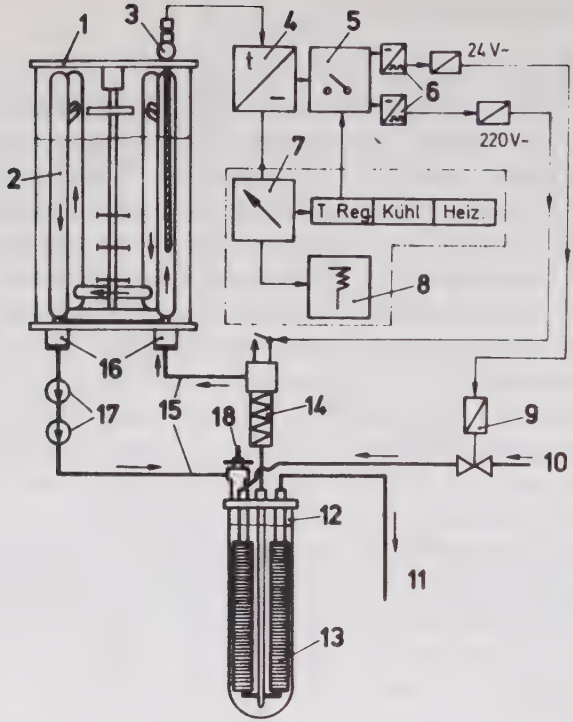


Abb. III 7: Temperaturregelung des Temperaturgefäßes

1) Fermentergefäß
2) Hohlschikanen
3) Widerstandsthermometer
4) Temperatur-Meßumformer
5) Temperaturregler
6) Impuls-Pausengeber
7) Analoganzeiger
8) Schreiber
9) Kühlwasser-Magnetventil
10) Kühlwasserzulauf
11) Kühlwasserrücklauf
12) Kühlgefäß
13) Wärmeaustauscher-Rippenrohre
14) Durchlauferhitzer
15) Geschlossener Temperierwasserkreislauf
16) Anschlußstutzen Temperierwasserkreislauf
17) Kreiselpumpen
18) Druckluftanschluß

Funktionsschema der pH-Regelung. Die Konstanthaltung des pH-Wertes im Kulturmedium erfolgte so, daß bei einer Abweichung des eingestellten pH-Sollwertes der Regler (4) Impulse an die entsprechenden Schlauchpumpen (9) weitergab,und diese pumpten dann, bis zur Erreichung des pH-Sollwertes, sterile Säure oder Lauge von den Vorratsbehältern in das Fermentergefäß (1). Die Pumpimpulse für Säure und Lauge wurden an getrennten Impulszählern (6) registriert. Der pH-Wert wurde durch ein Signal vom pH-Meßumformer am Zentralschreiber (8) aufgezeichnet.

Besondere Schwierigkeiten bereitete die Auswahl geeigneter Pumpschläuche (14); es wurden verschiedene Schlauchmaterialien einem dreiwöchigen Pumpversuch unterworfen: das am besten geeignete Material war gesinteter Silikonschlauch. Das von den Pumpen pro Impuls geförderte Flüssigkeitsvolumen zeigte während der dreiwöchigen Prüfperiode eine Abweichung von maximal $\pm$ 1 %. Ein mehrmaliges Einlegen des Schlauches in die Schlauchpumpe hatte dann keine größere Abweichung des Pumpvolumens zur Folge, wenn das eingelegte Schlauchstück immer die gleiche Länge hatte.
Die Säure - Lauge - Vorratsgefäße (10) hatten folgende Anschlüsse: Schlaucholive mit Rohr (16) bis zum Boden des Gefäßes zur Entnahme, steriler Stechanschluß (11) zur Nachfüllung und Wattefilter (12) mit Steckkupplung (13) zur Entlüftung und Drucküberlagerung. Eine Drucküberlagerung erfolgte dann, wenn sich beim Anschluß von Abluftanalysengeräten der Druck im Fermentergefäß erhöhte.
Die Sterilisierung erfolgte durch Autoklavieren der vom Fermentergefäß getrennten Vorratsgefäße (10) mit Schläuchen (14) und Stechnadeln (15). Die pH-Elektrode (2) wurde mit dem Fermentergefäß (1) sterilisiert. Die Pumpschläuche wurden vor dem Autoklavieren an der Anschlußstelle zum Vorratsgefäß abgeklemmt, um ein Eindringen von Säure während des Sterilisationsprozesses zu verhindern; nach ca. zehnmaligem Autoklavieren der mit 1N Schwefelsäure gefüllten Schläuche traten Zersetzungserscheinungen auf. Das Autoklavieren beeinflußte nicht das Pumpvolumen pro Impuls. Die pH-Elektrode der Type 465-35 (a=400) der Fa.

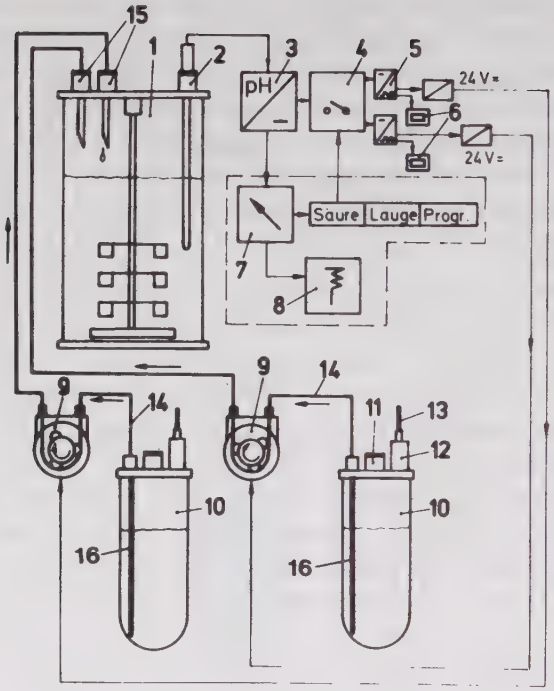


Abb. III 8: pH-Regelung

1) Fermentergefäß
2) pH-Elektrode
3) pH-Meßumformer
4) pH-Regler
5) Impuls-Pausengeber
6) Impulszähler
7) Analoganzeiger
8) Schreiber
9) Schlauchpumpe
10) Vorratsbehälter Säure - Lauge
11) Universalstechanschluß
12) Luft-Sterilfilter
13) Anschluß für Steckkupplung
14) Silikonschlauch
15) Stechnadel
16) Entnahmerohr

W.Ingold, Frankfurt, wurde vor dem Autoklavieren geeicht. Danach wurde das Fermentergefäß mit sterilfiltrierter Nährlösung (von bekanntem pH-Wert) gefüllt, die pH-Anzeige (7) überprüft und am Meßumformer (3) korrigiert.

B 3. Datenerfassung

Die Datenerfassung der Fermenteranlage (Abb. III 1) erfolgte mit zwei potentiometrischen Kompensationsschreibern: einem Zwölffach-Punktdrucker (Abb. III 1/3) Type Transokomp 288 der Fa. Withof, Kassel, und einem Zweikanal-Flachschreiber (Abb. III 1/23) Type BD9, der Fa. Kipp u. Zonen, Delft. Der Säure-Laugenverbrauch wurde mit einem Pump-Impulszähler (Abb. III 8/6) gemessen und in bestimmten Zeitabständen abgelesen.
Am Zwölffach-Punktdrucker wurden folgende Meßwerte registriert:

- pH-Wert
- Temperatur
- O_2-Gehalt Zuluft
- O_2-Gehalt Abluft
- CO_2-Gehalt Abluft oder Zuluft
- Volumen der Abluft oder Zuluft

Der Zwölffach-Punktdrucker wurde mit einem Papiervorschub von 20 mm/h gefahren, er war so eingestellt, daß jedes angeschlossene Gerät von zwei Kanälen alternativ erfaßt wurde.

Am Zweikanal-Flachschreiber wurden die Trübung und der Sauerstoffpartialdruck registriert; er wurde mit einem Papiervorschub von 30 oder 60 mm/h, je nach Versuchsanordnung, gefahren. Jeder Meßkanal war mit einer Grenzkontaktvorrichtung ausgerüstet, mit welcher Zweipunktregelungen (min.-max.) vorgenommen werden konnten. In Verbindung mit der Meßbereichsspreizung waren damit fein abgestimmte Regelungen möglich (siehe Sauerstoffmeß- und Regelanlage).

Die Energieversorgung der zwei Schreiber wurde durch einen Wechselspannungs-Stabilisator (Abb. III 1/26) Type WS-5, Wandel u.Goltermann, Reutlingen, konstant gehalten.

C. Sauerstoff-Meß- und Regelanlage

C 1. Voraussetzungen

Zur Ermittlung der optimalen Sauerstoffkonzentration für das Wachstum und Bchl.-Synthese sollte der pO_2 im Kulturgefäß über einen weiten Bereich konstant gehalten werden. Eine weitere Fragestellung ist die nach der Sauerstoffverwertung bei unterschiedlichen Wachstumsbedingungen. Dazu ist eine Erfassung des Gesamt-Sauerstoffverbrauchs erforderlich, um damit eine Sauerstoffbilanz aufzustellen. Diese Voraussetzungen ergeben folgende Forderungen an ein Sauerstoffmeß- und Regelsystem:

a) Messung und Konstanthaltung eines vorgegebenen Sauerstoffpartialdruckes im Fermentergefäß.
b) Erfassung des Sauerstoff-Gaswechsels.

Im folgenden werden die dafür gegebenen Möglichkeiten erörtert und die schließlich verwirklichte Lösung beschrieben.

C 2. Methoden zur Messung des pO_2

Sauerstoff ist durch sein positives Standardreduktionspotential von + 0,815 Volt ein universeller Elektronenakzeptor. Im molekularen Zustand ist er neben Stickoxyd, Stickstoffdioxyd und Chloroxyd stark paramagnetisch. Beide Eigenschaften werden zur Messung des pO_2 herangezogen. Folgende Methoden sind bekannt:

Chemisch

1. Oxydation
   Winkler-Methode, usw.

Elektrochemisch

1. Polarographisch
   Tropfende Quecksilberelektrode
   Polarographische Elektrode
   Galvanische Elektrode
2. Reaktionswärme
   Knallgasreaktion mit Edelmetallkatalysator

Physikochemisch

1. Manometrisch und Volumetrisch
   Sauerstoffabsorption durch Pyrogallol und Phosphor

Physikalisch

1. Paramagnetisch
   Paramagnetische Sauerstoffanalyse
2. Wärmeleitfähigkeit
   Gaschromatographie

Die chemischen, elektrochemischen und physikochemischen Meßmethoden beruhen auf der Reduktion des Sauerstoffs, wobei Sauerstoff verbraucht wird. Die Umsetzung bzw. Umsetzungsgeschwindigkeit verhält sich hierbei proportional zur Sauerstoffkonzentration.

Die physikalischen Methoden haben keine Umsetzung mit Sauerstoff zur Folge, sie sind weitgehend unabhängig von der Durchflußgeschwindigkeit des zu messenden Gases und erfassen auch Konzentrationen im ppm-Bereich.

C 3. pO_2-Elektroden

Ein Sauerstoff-Meßsystem für den Einsatz in Fermentern sollte folgende Forderungen erfüllen: Keine Kontamination des zu messenden Mediums, Sterilisierbarkeit, geringe Veränderung der Meßwertcharakteristik durch Hitzesterilisation, hohe Konstanz der Meßwertcharakteristik mit der Zeit (da die Elektroden während des Wachstumsprozesses schwer nacheichbar sind) und kurze Einstellzeit. Diesen Anforderungen kommen nur die polarographischen Elektroden vom CLARK-Typ (CLARK 1956) nach. Diese Elektroden haben eine Meßzelle mit Kathode, Anode und Elektrolyt, welche durch eine Polymer-Membran vom Meßmedium getrennt ist. Das Meßprinzip beruht auf der Reduktion von Sauerstoff an einer Kathode mit einer Potentialdifferenz von 0,6 - 0,8 Volt. Die mit einem konstanten Potential polarisierte Elektrode gibt einen elektrischen Strom ab, der proportional zu den an der Kathode reduzierten Sauerstoffatomen ist. Dem Meßprinzip nach sind solche Elektroden amperometrisch im Gegensatz zu potentiometrischen Elektroden wie z.B. die pH-Elektroden (LESSLER 1972). Nach DAVIES (1962) verläuft die Sauerstoffreduktion an der Kathode in zwei Schritten:

$$O_2 + 2\,H_2O + 2\,e^- \longrightarrow H_2O_2 + 2\,OH^-$$

$$H_2O_2 + 2\,e^- \longrightarrow 2\,OH^-$$

$$O_2 + 2\,H_2O + 4\,e^- \longrightarrow 4\,OH^-$$

Die Anode dient lediglich als Referenzelektrode.
Bei einer Potentialdifferenz von 0,6 - 0,8 Volt wird nur Sauerstoff an der Kathode reduziert, in Abwesenheit von Sauerstoff fließt kein Strom. Die Erhöhung der Potentialdifferenz über 0,8 Volt hat die Hydrolyse von Wasser zur Folge (KREBS u. HADDAD 1972)

$$2\,H_2O + 2\,e^- \longrightarrow 2\,OH^- + H_2$$

Die Potentialdifferenz kann durch eine von außen angelegte Spannung erzeugt werden; solche Sauerstoffelektroden werden als polarographische Elektroden bezeichnet. Wird die Spannung innerhalb der Elektrode erzeugt, so werden diese "galvanische Elektroden" benannt. Die von JOHNSON et al. (1964) beschriebene, sterilisierbare galvanische Elektrode hat eine Silber-Kathode, eine Blei-Anode und ist mit Acetat-Puffer gefüllt. Polarographische Elektroden haben Platin- oder Gold-Kathoden, Anoden aus chloriertem Silber und verwenden einen KCl-Elektrolyten. Die pO_2-Messung wird bei amperometrischen Elektroden durch Temperatur, Strömungsgeschwindigkeit des Meßmediums, Membranmaterial, Kathodenoberfläche und Durchmesser der Elektrolytschicht beeinflußt. Polarographische Elektroden sind gleichen Störgrößen ausgesetzt, welche aber hier einfacher zu kompensieren sind, da die Polarisationsspannung nicht innerhalb der Meßzelle erzeugt wird. Angaben über den Einfluß der Sterilisation autoklavierbarer Elektroden fehlen in der Literatur, was eine Prüfung erforderlich machte. An drei verschiedenen Typen sterilisierbarer pO_2-Elektroden und als Referenz an einer nicht sterlisierbaren wurden folgende Parameter geprüft: Änderung der Elektrodenempfindlichkeit im Zeitraum nach der Sterilisation, Einfluß der Rührdrehzahl und Temperatur auf die Elektrodenempfindlichkeit, Einstellzeit bei Änderung der Sauerstoffkonzentration, Meßgenauigkeit bei unterschiedlichem pO_2 und Veränderung der Eichung durch die Sterilisation.

Folgende Elektroden wurden geprüft:
Nicht sterilisierbar, polarographisch; WTW, Weilheim.
Mit sterilisierbarer Außenhülle, polarographisch; Eschweiler, Kiel (RING et al. 1969).
Voll sterilisierbar, polarographisch; Instrumentation Laboratory Inc., Lexington, Mass.
Voll sterilisierbar, galvanisch; Fa.Braun, Melsungen.
Voll sterilisierbar, galvanisch; Yellow Springs Instrument Co., Yellow Springs, Ohio.

Tab. III 3: Prüfung von Sauerstoffelektroden im Fermenter

Elektrodenart	Einstell-zeit (min)	Änderg. Eichpkt. durch Sterilis. (%)	Messgenauigkeit. Max.Fehler-grenze (% d.Messwertes)	Einfluß der Rührgeschw. auf die Messung (% des Messwertes je 100 Upm)
Polarogr.nicht sterilisierbar	5,8	-	-0,9 bis +2,3	1,2
Polarogr.voll sterilisierbar	5,4	3,7	-0,4 bis +1,6	0,6
Polarogr.mit sterilisierb. Außenhülle	9,5	-	-1,2 bis +7,1	0
Galvanisch, voll sterilisierbar	10,7	31	+0,7 bis +3,7	8,7

Die Prüfung erfolgte mit allen vier Elektroden gleichzeitig im Fermentergefäß mit 10 l Aqua dem. bei 28°C, einer Rührgeschwindigkeit von 400 Upm und einer Belüftungsrate von 40 l Luft·h^{-1}. Sterilisation 25 min bei 120°C im Autoklaven. Die Prüfungsergebnisse stellen Mittelwerte von 3 Messungen dar. Die Meßergebnisse der zwei galvanischen Elektroden wurden zusammengefaßt. Der Zeitraum bis zur Erreichung der oberen und unteren Eichpunkte (durch Begasung mit Luft oder Stickstoff) wird als Einstellzeit bezeichnet. Die Prüfung der Meßgenauigkeit erfolgte im pO_2-Bereich von 0 bis 160 Torr; der pO_2 wurde durch Gasgemische mit unterschiedlichen Anteilen an Stickstoff und Sauerstoff eingestellt und durch Vergleichsmessungen des Gasgemisches mit einem paramagnetischen Sauerstoffanalysator (Typ OA 184, Servomex Controls Ltd., Crowborough, Sussex. Abb. III1/1) geeicht.

In Tabelle III 3 sind die Ergebnisse dieser Prüfung zusammengefaßt (LEHMANN 1973). Die galvanischen Sauerstoffelektroden hatten eine größere Trägheit und der Einfluß der Rührgeschwindigkeit auf die Messung war größer als bei polarographischen Elektroden. Die galvanischen Elektroden zeigten bis zur dritten Sterilisation eine größere Drift(Veränderung des oberen Eichpunktes mit der Zeit) als die polarographischen Elektroden.

Zur Messung und Regelung des pO_2 im Fermenter wurde aufgrund der Prüfungsergebnisse die polarographische Sauerstoffelektrode mit sterilisierbarer Außenhülle der Fa. Eschweiler, Kiel und, nach Verfügbarkeit, die voll sterilisierbare polarographische Elektrode von Instrumentation Lab.Inc., Lexington (Mass.) verwendet.

C 4. Paramagnetische Sauerstoffmessung

Die paramagnetische Sauerstoffmessung beruht auf dem starken temperaturabhängigen Paramagnetismus des molekularen Sauerstoffs. Die Sauerstoffmoleküle richten sich in einem magnetischen Feld nach den Feldlinien aus. Die paramagnetischen Sauerstoffanalysatoren verwendeten unterschiedliche Meßprinzipien: die Messung der Sauerstoffkonzentration kann so erfolgen, daß das Meßgas bei konstanter Temperatur durch ein starkes inhomogenes magnetisches Feld fließt. In diesem Feld befinden sich Hohlkugeln mit einer Füllung aus diamagnetischem (= nicht-paramagnetischem) Gas, z.B. Stickstoff; diese Kugeln erfahren durch den Sauerstoff, der sie aus dem magnetischen Feld verdrängt, eine Auslenkung, die proportional der Sauerstoffkonzentration ist. Diese Auslenkung dient dann als Meßbasis (Servomex-Sauerstoffanalysator). Ein anderes Meßsystem (Sauerstoffanalysator Typ Magnos, Fa.Hartmann & Braun, Frankfurt) beruht auf der Temperaturabhängigkeit des Paramagnetismus von molekularem Sauerstoff. Die Strömungsgeschwindigkeit in einem beheizten Röhrchen im inhomogenen magnetischen Feld ist der Sauerstoffkonzentration des Gases proportional und dient so als Meßbasis. Das vom Servomex Sauerstoffanalysator verwendete Prinzip schien eine geringere Störungsanfälligkeit durch äußere Einflüsse zu gewährleisten. Zur Messung des pO_2 in der Gasphase wurde deshalb ein paramagnetischer Sauerstoffanalysator vom Typ OA 184 der Fa. Servomex, Crowborough (Sussex) verwendet. Dieser Analysator

verfügte über zwei unabhängige Meßkanäle; die für die Messung optimale Durchflußrate war 100 ml/min.
Eine Dampfsättigung des Meßgases verändert bei gleichbleibendem Gesamtdruck den Partialdruck der darin enthaltenen Gase; im Falle von Sauerstoff würde diese Gesetzmäßigkeit das Meßergebnis des Sauerstoffanalysators verfälschen. Enthält z.B. das trockene Meßgas bei einem atmosphärischen Druck von 760 Torr 21 % Sauerstoff, so ist der Sauerstoffpartialdruck (pO_2) $\frac{760 \cdot 21}{100}$ = 160 Torr; wird dieses Gas bei 20°C mit Wasserdampf gesättigt (Sättigungsdampfdruck 20 Torr), so verringert sich der pO_2 auf $\frac{(760 - 20) \cdot 21}{100}$ = 156 Torr. Die Fermenterzuluft und die Gase zur Eichung des Sauerstoffanalysators waren trocken, die Fermenterabluft dagegen wasserdampfgesättigt; dies hätte eine Verringerung des pO_2 in der Abluft vorgetäuscht. Die Fermenterabluft wurde daher mit einem Wasserkühler (Abb. III 1/15) auf 10°C herabgekühlt, die danach gemessenen O_2 - Werte wurden um den Sättigungsdampfdruck bei 10° C korrigiert.

C 5. pO_2 Meß- und Regelanlage

Beim Aufbau der pO_2-Regelanlage mußten berücksichtigt werden:

1. Die Mindestdurchflußmenge des paramagnetischen Sauerstoffanalysators (6 l/h).
2. Der zunehmende Sauerstoffbedarf der Bakterienkulturen während der Wachstumsversuche.
3. Die Einstellzeit der Sauerstoffelektrode im Fermenter.

Zur Regelung des pO_2 im Fermentergefäß wurde zuerst eine Sauerstoffmeß- und Regeleinheit vom Typ F 51 der Fa. Eschweiler & Co., Kiel (Abb. III 1/25) eingesetzt; diese Einheit hatte eine Zweipunktregelung und eine polarographische Sauerstoffelektrode mit sterilisierbarem Mantelrohr. Die Regelung des pO_2 im Fermentergefäß erfolgte mit zwei Magnetventilen; diese waren für die Regelstellung "Minimum" an Luft oder Stickstoff-Luftge-

misch und für die Regelstellung "Maximum" an Stickstoff angeschlossen. Die an der Regeleinheit einstellbaren Pause-Impulszeiten für die Gaszugabe von 60 bis 6 sec waren im Vergleich zur durchschnittlichen Einstellzeit des pO_2 im Fermentergefäß (9,5 min.) zu kurz (siehe Tab. III 3). Die Gaszugabe war daher zu groß und der pO_2 schwankte in periodischen Zyklen über und unter dem eingestellten pO_2-Sollwert. Bei einem pO_2-Sollwert von 5 Torr verursachte die Über- bzw. Untersteuerung eine Abweichung von $\pm$ 2 Torr (= $\pm$ 40 % Abweichung vom Sollwert).

Nachdem die vollsterilisierbare polarographische Sauerstoffelektrode verfügbar war, wurde ein eigenes Regel- und Meßsystem zur Konstanthaltung des pO_2 und zur Erfassung des Gasstoffwechsels aufgebaut. Folgende Bauteile wurden dazu verwendet:

Sterilisierbare polarographische Sauerstoffelektrode und Verstärker Typ 531 (Abb. III 1/24) Instrumentation Lab. Inc., Lexington, Mass.

Zweikanal-Flachschreiber mit Grenzkontaktvorrichtung (s. Kap. B3) Datenerfassung)

Stellglied, Motor-Nadelventil, Fa. Braun, Melsungen (Abb. III 1/18).

Relais und Stromversorgung zur Steuerung des Stellgliedes (Abb. III 1/24)

Impuls-Pause-Zeitglied: Zeitstufe Type MRT 910 D/R, Fa. Rösberg, Karlsruhe.

Thermischer Durchflußmesser, Type 5810, 0 - 5000 ml/min, Brooks Instrument Div., Emerson Electric Co., Hatefield, Pa. (Abb. III 1/16).

CO_2-Analysator: Infrarot-Gasanalysator Uras 2T mit 2 Meßbereichen, Fa. Hartmann & Braun, Frankfurt (Abb. III 1/6).

Steckkupplungen: Serto-Miniaturkupplungen aus Messing, Fa. Jacob, Kassel.

Gasleitungen: Polyaethylenrohre mit 4 mm Innendurchmesser für Zuluft und 6 mm für Abluft, Fa. Jacob, Kassel.

Differenzdruckregler Modell-Nr. D 10 A 3139 N - D 53 RB 2110 für 0 - 110 Nl h^{-1}, Fa.Fischer & Porter, Göttingen.

Der Aufbau der Anlage ist in Abb. III 9 dargestellt (siehe auch Abb. III 1). Das dem pO_2-Wert proportionale Signal der Sauerstoffelektrode wurde über den Meßumformer (2) an den Schreiber weitergegeben. Die Grenzkontakte am Schreiber (3) schlossen einen Stromkreis beim Erreichen des vorgewählten Sollwertes; über diesen Kreis und das Zeitglied der Stromversorgung und das Relais (4) wurde das Motor-Nadelventil (5) so gesteuert, daß die Zuluftmenge zur Einstellung des pO_2-Sollwertes im Fermentergefäß ausreichte. Die Belüftungsrate wurde so kontinuierlich an den Sauerstoffbedarf der Bakterienkulturen angepaßt. Durch den kontinuierlichen Gasstrom - anstelle der impulsweisen Zugabe über die Magnetventile - war eine optimale Messung der Abluft am paramagnetischen Sauerstoffanalysator (17) möglich. Bei einem geringen Sauerstoffbedarf der Bakterienkulturen war die Begasungsrate für die optimale Funktion der Abluftanalysengeräte zu gering; die Bakterienkulturen wurden dann zur Erhöhung der Durchflußrate auf ca. 20 $Nl \cdot h^{-1}$ mit einem Luft-Stickstoffgemisch begast. Die Gasgemische wurden in einem Gasmischstand (6) mit Differenzdruckregler (7) für konstanten Vordruck bei variablem Hinterdruck hergestellt. Das Abgas wurde über ein beheiztes Abluftfilter (9) und eine beheizte Abluftleitung (10) vom Fermenter (8) zum Abgaskühler (11) geleitet. Bei starker Schaumbildung im Fermenter war die chemische externe Schaumbekämpfung (Abb. III 6) dazwischengeschaltet. Anschließend wurde in einem thermischen Durchflußmesser (12 u.13) die Gasdurchflußrate gemessen und am Zwölffachpunktdrucker (15) (siehe Datenerfassung) registriert. Der Kohlendioxydgehalt der Abluft wurde dann im Infrarot-Gasanalysator gemessen (16) und am Punktdrucker registriert. Abschließend wurde der Sauerstoffgehalt der Abluft in einem paramagnetischen Sauerstoffanalysator (17) gemessen. Der Sauerstoffanalysator hatte zwei vorgeschaltete Durchflußregler im Nebenschluß (18); sie wurden so eingestellt, daß Mengen >6 l/min. über den Nebenschluß (21) abgeleitet wurden. Im zweiten Meßkanal des Sauerstoffanalysators wurde gleich-

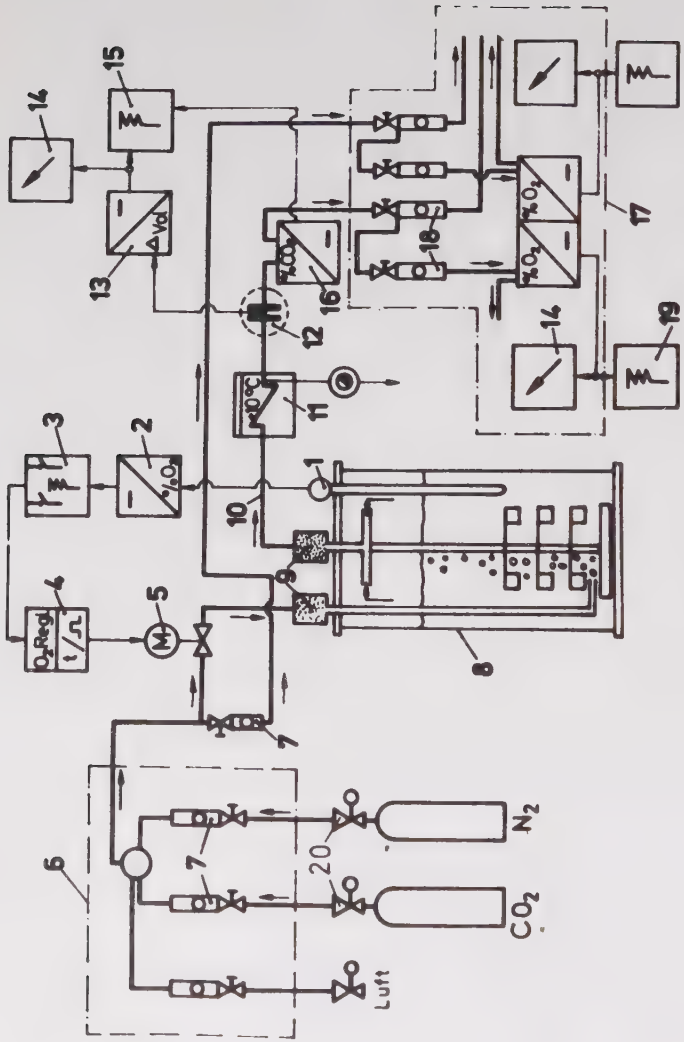


Abb. III 9: Sauerstoff-Meß- und Regelanlage

Abb. III 9: Sauerstoff-Meß- und Regelanlage

1) Sauerstoff-Elektrode
2) Meßumformer für Sauerstoff
3) Schreiber mit Grenzkontakteinrichtung
4) Zeitglied, Relais und Stromversorgung
5) Motor-Nadelventil
6) Gasmischstand
7) Differenzdruckregler
8) Fermentergefäß
9) Luft-Sterilfilter
10) Abluftleitung
11) Abluftkühler mit Kondenswasserbehälter
12) Thermischer Gas-Durchflußmesser
13) Meßumformer für Durchflußmessung
14) Analoganzeiger
15) Zweikanalschreiber oder Punktdrucker
16) CO_2-Analysator
17) Paramagnetischer O_2-Analysator
18) Durchflußregler mit Nebenanschluß
19) Schreiber (Punktdrucker)
20) Druckminderer
21) Nebenschlußableitung
22) Zuluft

zeitig der Sauerstoffgehalt der Zuluft (7 u. 22) gemessen und der Sauerstoffgehalt als Differenz zwischen Abluft und Zuluft oder die absoluten Sauerstoffgehalte am Punktdrucker registriert.

Mit dieser Meß- und Regelvorrichtung konnte der pO_2 im Fermentergefäß über mehrere Wochen konstant gehalten werden und gleichzeitig der Sauerstoffverbrauch der Bakterienkultur gemessen werden. Die pO_2-Regelung zeigte keine Übersteuerung; bei einem pO_2-Sollwert von 5 Torr wurden Abweichungen $\pm$ 0,1 Torr (= 2 %) festgestellt.

D. Kontinuierliche Trübungsmessung:

Die Trübung (O.D.) der hier untersuchten phototrophen Bakterien korrelierte gut mit der Zellzahl (siehe Abb. IV 1), wenn die Extinktion im Absorptionsminimum des Bacteriochlorophylls (650 - 700 nm) gemessen wurde. Unter normalen Wachstumsbedingungen korrelierte auch die O.D. gut mit dem Proteingehalt und der Trockensubstanz der Zellen, so daß die O.D. als universeller Wachstumsparameter eingesetzt werden konnte.

Es wurde versucht, die Trübung kontinuierlich im Fermentergefäß mit einer Meßsonde zu messen. Die Sonde (GST-Regeltechnik GmbH., Bochum) mit zwei Lichtquellen und zwei Empfängern konnte im Fermentergefäß sterilisiert werden, aber die bei der Begasung und Rührung entstehenden Luftblasen störten die Messung so, daß die Sonde für diesen Zweck nicht anwendbar war.

Versuche zur kontinuierlichen Trübungsmessung außerhalb des Fermentergefäßes mit Durchflußküvette und Filterphotometer zeigten die gleiche Störung durch Luftblasen. Der dazu entwickelte Gasblasenabscheider (Abb. III 10/2) entfernte die Luftblasen vollständig und ermöglichte eine störungsfreie Mes-

sung. Probeläufe mit einer Dauer von mehr als 5 Tagen hatten zunächst einen Küvettenbewuchs mit Bakterien zur Folge. Eine Erhöhung der Durchflußgeschwindigkeit auf 437 Meßkammerwechsel/min (entsprechend einer Durchflußgeschwindigkeit von ca. 18 cm/sec) konnte das Bewachsen der Küvette vollständig verhindern, so daß auch nach mehrwöchigen Fermenterlauf die Küvette nicht ausgetauscht werden mußte.

In Abb. III 10 wird der Aufbau der kontinuierlichen automatischen Trübungsmessung gezeigt.

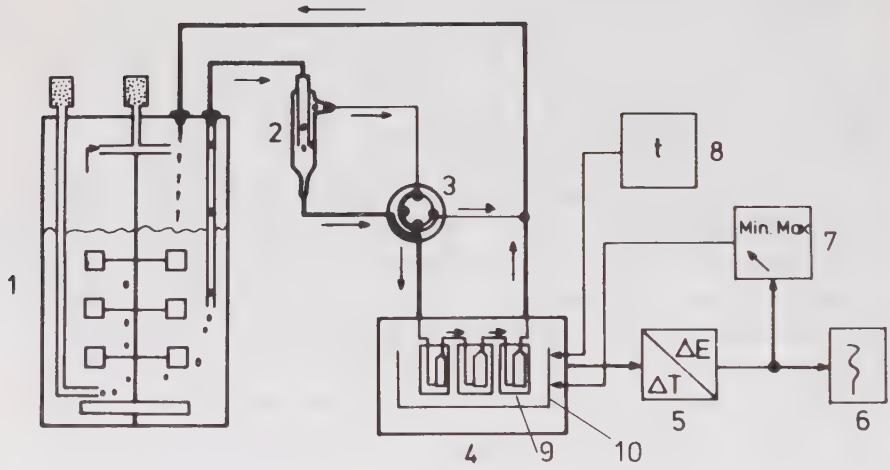


Abb. III 10: Kontinuierliche Trübungsmessung

1) Fermentergefäß
2) Gasblasenabscheider
3) Schlauchpumpe
4) Filterphotometer
5) Transmission-Extinktion Wandler
6) Analogschreiber
7) Grenzkontakteinrichtung
8) Schaltuhr
9) Durchflußküvetten
10) automatischer Küvettenwechsler

Die Bakteriensuspension wird vom Fermentergefäß (1) über einen Gasblasenabscheider (2) durch mehrere in Serie geschaltete Durchflußküvetten (9) verschiedener Schichtstärke gepumpt. Die Pumpschläuche hatten einen Innendurchmesser von 5 mm und wurden bis zu den Durchflußküvetten mit Reduzierstücken aus Glas auf 2 mm verengt. Dadurch wurde die Durchflußgeschwindigkeit von 2,9 cm/sec im Schlauch mit 5 mm Ø auf 18,5 cm/sec in der Küvettenmeßkammer erhöht. Die Trübung wurde dann in einer Küvette geeigneter Schichtstärke gemessen, so daß die Extinktion < 1 war. Die gemessene Transmission wurde mit einem Transmissions-Extinktionswandler (5) auf Extinktion umgeformt und am Analogschreiber registriert (6). Eine Grenzkontakteinrichtung (7) am Schreiber konnte so eingestellt werden, daß bei $E > 1$ ein Signal an einen automatischen Küvettenwechsler (10) gegeben wurde und dieser die Küvette mit geringerer Schichtstärke in den Lichtweg brachte. Gleichzeitig konnte der automatische Küvettenwechsler durch eine Zeiteinheit (8) in vorgewählten Zeitabständen so angesteuert werden, daß eine Referenzküvette mit steriler Nährlösung gemessen wurde. Die gemessene Bakteriensuspension floß dann wieder in den Fermenter zurück.

Ein Spektralphotometer mit automatischem Küvettenwechsler stand nur probeweise zur Verfügung, so daß die Messungen in dieser Arbeit mit manuellem Küvettenwechsler durchgeführt wurden.

Die kontinuierliche Trübungsmessung hatte folgende Baugruppen:

Filterphotometer Eppendorf mit manuellem Küvettenwechsler (Abb. III 1/21) und Transmissions-Extinktionswandler L 1853 (Abb. III 1/22) der Fa. Netheler & Hinz GmbH, Hamburg.
Analogschreiber mit Grenzkontakteinrichtung oder Punktdrucker (siehe Datenerfassung).
Zeitglied Type MRT 910 D/R, Fa. Rösberg, Karlsruhe (nur bei Betrieb mit automatischem Küvettenwechsler).
Schlauchpumpe Ismatec mp-4; Ismatec SA, Zürich (Abb. III 1/20).
Durchflußküvetten mit 1,2 u. 5 mm Schichtstärke, Type 178-OS, Fa. Hellma GmbH, Müllheim/Baden.

Blasenfänger, Herstellung in Zusammenarbeit mit Fa. P. Ochs, 3401 Lenglern (Abb. III 1/19).
Pumpschläuche aus Viton.
Abb. III 11 zeigt die Parallelität der kontinuierlichen und der manuellen Trübungsmessung. Im oberen Kurvenpaar (a) weicht

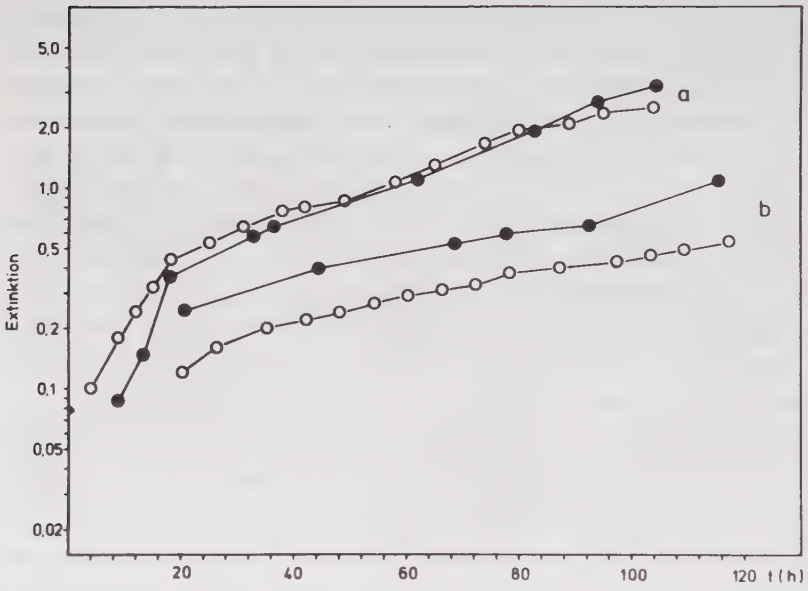


Abb. III 11: Vergleich zwischen manueller und automatischer, kontinuierlicher Trübungsmessung.

Die Messungen wurden bei zwei Wachstumsversuchen mit R.fulvum St.10060 durchgeführt. Das Wachstum erfolgte unter Standardbedingungen mikroaerob im Dunkeln. a = Wachstumsversuch bis E.2,7 und b = Wachstumsversuch bis E 0,91. Die manuelle Trübungsmessung erfolgte bei 650 nm gegen Aqua dest., die Zellsuspension wurde, falls erforderlich, durch Verdünnen mit Aqua dest. auf E 0,5 eingestellt. Die automatische-kontinuierliche Trübungsmessung wurde mit der im Text beschriebenen Apparatur mit 0,5cm Küvetten bei 691 nm durchgeführt. Im Versuch a wurde gegen Aqua dest., im Versuch b gegen Nährlösung gemessen.
● = manuelle Trübungsmessung
O = automatische, kontinuierliche Trübungsmessung.

die kontinuierliche Trübungsmessung erst bei einer E $>$ 1,0(d 0,5 cm) von der manuellen Messung (Verdünnung der Suspension auf E$<$0,5) ab. Schwankungen in der Wachstumsgeschwindigkeit sind, bedingt durch die Zeitabstände der manuellen Probenahme, nur bei der kontinuierlichen Trübungsmessung sichtbar. Die unteren Kurven (b) in Abb. III 11 zeigen die Parallelität der Meßwerte bei niedrigen Zellkonzentrationen. (Der Abstand beider Kurven beruht auf der unterschiedlichen Referenzflüssigkeit). Durch die Meßbereichsspreizung am Transmission-Extinktion-Wandler und am Analogschreiber konnte eine hohe Ablesegenauigkeit im unteren Absorptionsbereich erzielt werden. Mit der Durchflußküvette von 0,1 cm Schichtstärke ist eine Messung bis 10 x E 1,0(d 0,1cm)=E 10 möglich (siehe oben). Durch die Verstärkerschaltung am Photometer kann die Messung auf E 10 x 2 = E20 erweitert werden. Mit einer Küvettenschichtstärke von 0,05 cm würde eine Messung bis E = 40 möglich werden.

E. Beleuchtungsanlage

Das in vivo Absorptionsspektrum von R. acidophila in Abb. III 12 zeigt Bchl.-Maxima von 866, 809, 592 und 378 nm und Carotinoid-Maxima von 526, 491 und 465 nm. GÖBEL (1973) fand bei Rp. capsulata, daß bei alleiniger Absorption der Licht-Quanten durch die Carotinoide die Quantenausbeute nur 80 % der Ausbeute durch Bchl. erreichte. Leuchtstoffröhren mit ihren Emissionsmaxima unterhalb von 600 nm konnten daher zur Beleuchtung nicht verwendet werden; die Emissionsmaxima von Xenonlampen oberhalb von 800 nm, sind auf wenige Wellenlängen begrenzt und decken sich nicht mit den langwelligen Absorptionsmaxima der Rhodospirillaceae Es wurden daher Wolframdraht-Glühlampen mit ihrer breiten Emission im langwelligen Bereich verwendet; der hohe Anteil der nicht verwertbaren Strahlung oberhalb 900 nm mußte abgeführt werden, da

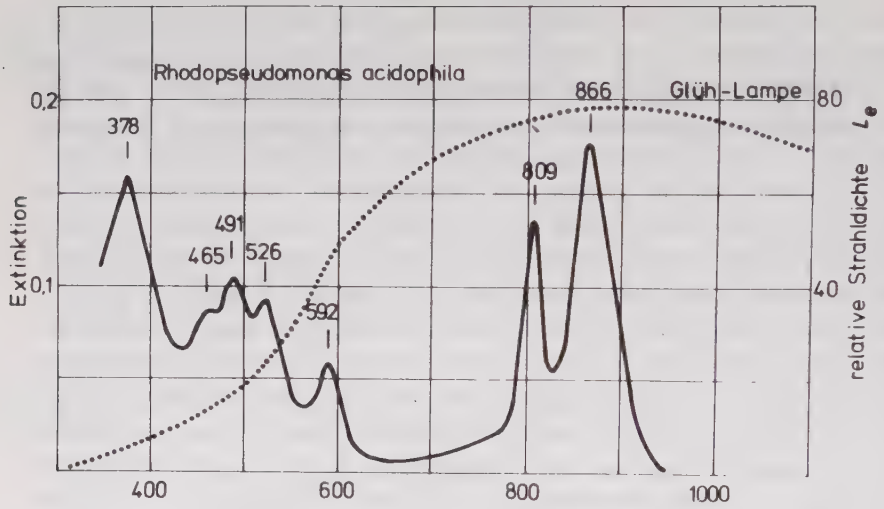


Abb. III 12: Absorptionsspektrum von Rp. acidophila und Strahldichteverteilung einer Wolframdraht-Glühlampe.

Das Absorptionsspektrum wurde im Zweistrahlphotometer DMR 21 der Fa. Zeiss mit Integrationssphäre aufgenommen. Die Strahldichteverteilung der Wolframdraht-Glühlampe stammt von der Fa. Osram und wurde auf den hier abgebildeten Maßstab reduziert.

sonst das Fermentergefäß zu stark aufgeheizt worden wäre. Eine Luftkühlung der Lampen führte zu starker Aufheizung des Raumes, so daß einer Wasserkühlung der Vorzug gegeben wurde.

Abb. III 13 zeigt ein Funktionsschema der Beleuchtungsanlage (LEHMANN, 1973). Sechs Glühlampen mit 500 Watt wurden in Plexiglasküvetten (2) eingebaut und rund um das Fermentergefäß angeordnet (Abb. III 1/11). Die Lampenleistung konnte über einen ferngesteuerten Transformator (4) kontinuierlich verändert werden (5). Eine Temperatursicherung (3) war so geschaltet, daß bei einer Aufheizung des Kühlwassers auf 50°C der Stellmotor den Transformator abschaltete. Die Lampen wurden direkt vom Kühlwasser umspült und dieses wurde mit einer Pumpe (7) im geschlos-

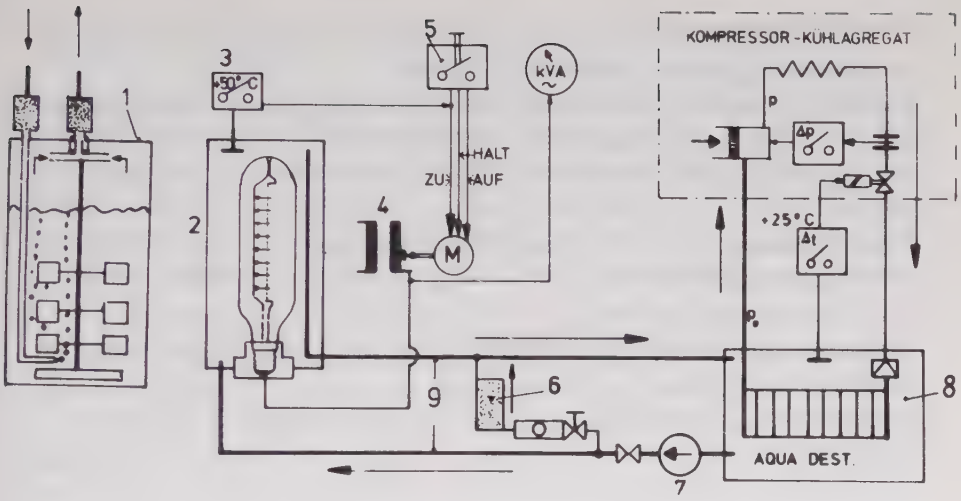


Abb. III 13: Beleuchtungsanlage

1) Fermentergefäß
2) Lampengehäuse
3) Übertemperatursicherung
4) Transformator mit Stellmotor
5) Fernsteuerung für Trenntransformator
6) Kühlwasserfilter
7) Umwälzpumpe
8) Kühlwasserbehälter
9) Kühlmittelkreislauf

senen Kreislauf (9) umgewälzt. Im Kühlwasserbehälter (8) wurde das Wasser über einen Wärmeaustauscher auf +25°C gekühlt. Das Kompressor-Kühlaggregat befand sich außerhalb des Gebäudes. Ein Wasserfilter (6) im Wasserkreislauf hielt das Wasser partikelfrei, so daß im dreijährigen Betrieb kein Wasserwechsel erforderlich war. Die direkte Lampenkühlung mit einem Wassermantel von minimal 3 cm verhinderte eine Erwärmung des Fermentergefäßes und verlängerte die Brenndauer der Lampen außerordentlich: Die nominale Brenndauer von 500 h wurde bisher um 700 h überschritten, ohne daß ein Lampenwechsel erforderlich gewesen wäre. Mit der Beleuchtungsanlage konnten Rhodospirillaceae unter anaeroben Wachstumsbedingungen im Licht bis zu einer O.D.von E_{650}= 8,0 angezogen werden. Bei einer herkömmlichen Beleuchtung mit

Punktstrahlern wurden O.D. von E_{650} = 3,0 erreicht.

Es wurden folgende Bauteile verwendet:
Lampengehäuse aus Plexiglas, Herstellung in Zusammenarbeit mit Fa. Jungkeit, 3411 Angerstein (Abb. III 1/11).
Nitrasofittenlampen 500 Watt 220 V, Type 544686 D, Fa. Osram, Hamburg.
Transformator, 3,2 kVA, Type TJMT, Ruhstrat KG, 3401 Lenglern.
Kühlaggregat, 2800 Kcal $\cdot h^{-1}$, Herstellung in Zusammenarbeit mit Fa. R.Wiese, Göttingen.
Umwälzpumpe, Kreiselpumpe 500 W, Type ES 50/22/3, Meßgeräte-Werk Lauda, Lauda.
Wasserfilter, Type MCS 001 CV 16 Z 2, Pall GmbH, Dreieichenhain.

IV. Experimente und Ergebnisse zur Wachstumsphysiologie

Die Experimente zur Wachstumsphysiologie sollen die in der Einleitung (Kap. I) aufgestellten Modellvorstellungen über die Art des Wachstums und der Energiegewinnung aerob im Dunkeln bei braunen Rhodospirillen prüfen. Da diese Modelle auf Ergebnissen mit fakultativ aeroben Rhodospirillaceae basieren, sollen die Versuche unter gleichen Voraussetzungen an einer Bakterienart dieser Gruppe durchgeführt werden.

Nach der 1. Arbeitshypothese in Kap. I ist das System zur oxidativen Energiegewinnung an einen hohen Photosynthesepigmentgehalt gebunden. Außerdem wurde angenommen, daß die Bildung der Photosynthesepigmente wie bei den fakultativ aeroben Arten bei einem höheren Sauerstoffpartialdruck reprimiert wird. Unter diesen Voraussetzungen sollte das aerobe Wachstum nach Absinken des Pigmentgehaltes unter eine kritische Konzentration zum Stillstand kommen. In den Wachstumsversuchen wurde deshalb auf den Zusammenhang zwischen Wachstum und dem in der Zelle vorhandenen Bacteriochlorophyllgehalt (spez. Bchl.-Gehalt) besonderer Wert gelegt. Gleichzeitig wurde das Ziel verfolgt, die Auswirkung der Sauerstoffkonzentration und der Lichtintensität auf den spezifischen Bacteriochlorophyllgehalt bei den braunen Rhodospirillen festzustellen. Damit sollte ermittelt werden, ob die geringere Sauerstoffverträglichkeit der braunen Rhodospirillen mit einer von den fakultativ aeroben Arten abweichenden Pigmentregulation verbunden ist.

In zwei weiteren Modellen (2. u. 3. Arbeitshypothese, Kap.I) wurde angenommen, daß braune Rhodospirillen die oxidative Energiegewinnung mit einem Elektronentransportsystem (ETS) durchführen, das eine geringere Anpassung an den Sauerstoff aufweist

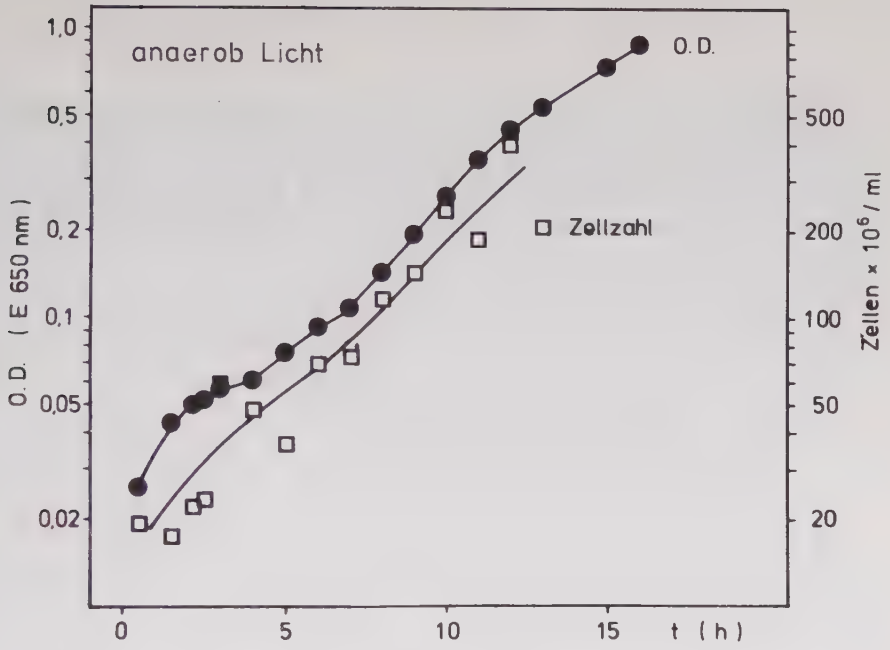
als das ETS der fakultativ aeroben Arten. Geht man davon aus, daß eine geringere Anpassung des ETS eine verminderte oxidative Energiegewinnung zur Folge hat, so sollte sich dies an unterschiedlichen Wachstumsgeschwindigkeiten der fakultativ aeroben Rhodospirillaceae und der braunen Rhodospirillen unter aeroben Bedingungen im Dunkeln zeigen.

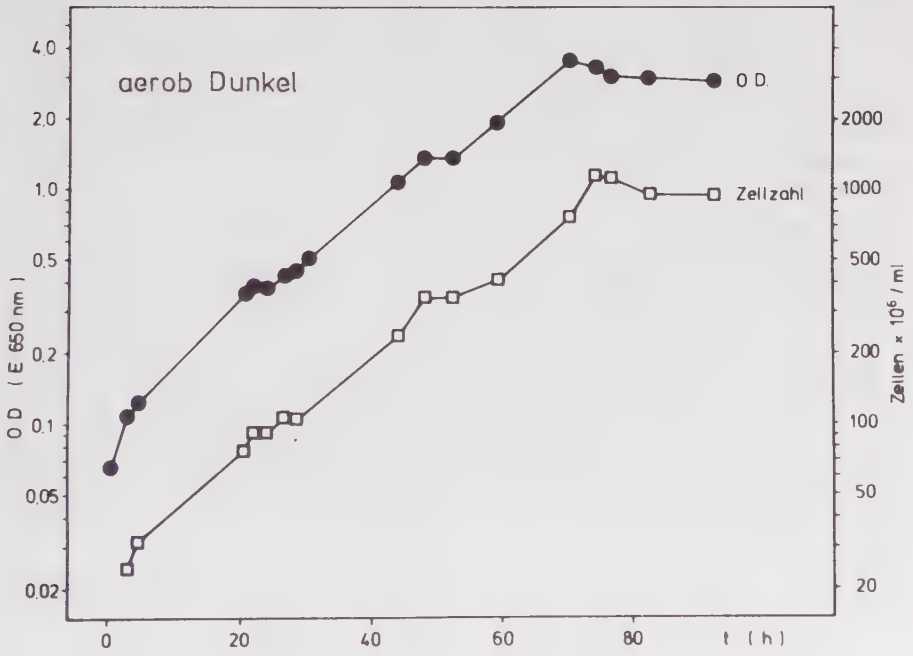
A. Allgemeines zur Wachstumskinetik

Die Wachstumsgeschwindigkeit wurde anhand der logarithmisch aufgetragenen Zunahme der Trübung gegen die Zeit berechnet. Vergleichende Messungen von Trübung und Zellzahl an phototroph und chemotroph kultivierten Rp. acidophila (Abb.IV 1) zeigen, daß die Trübung (O.D. gemessen im Absorptionsminimum der Photosynthesepigmente, siehe Kap. III D) der Zellzahl proportional ist. Gleiche Ergebnisse wurden mit anaerob im Licht und mikroaerob im Dunkeln gewachsenen R. molischianum, R. fulvum und R. photometricum erzielt.

Abb.IV 1: Proportionalität von Trübung und Zellzahl bei Rp. acidophila St. 7050.

Das Wachstum erfolgte anaerob im Licht und aerob im Dunkeln unter Standardbedingungen, abweichend davon enthielt die Nährlösung bei aerobem Wachstum 5 g Na-Succinat und 1,5 g NH_4Cl pro l. Die Zellzahl wurde mit Zählkammern (s.Methoden) ermittelt. Die Optische Dichte (O.D.) wurde bei E_{650} 0,2 - 0,8 gemessen.


anaerob Licht
O.D.
Zellzahl
O.D. (E 650 nm)
Zellen × 10⁶ / ml
1,0
0,5
0,2
0,1
0,05
0,02
500
200
100
50
20
0
5
10
15
t (h)


aerob Dunkel
O D.
Zellzahl
O D (E 650 nm)
Zellen × 10⁶ / ml
4.0
2.0
1.0
0.5
0.2
0.1
0.05
0.02
2000
1000
500
200
100
50
20
0
20
40
60
80
t (h)

Die Berechnung der Wachstumsraten erfolgte nach den von HERBERT et al. (1956) aufgestellten Gleichungen. Diese Gleichungen sind in der statischen Kultur im Gegensatz zur kontinuierlichen Kultur nur anwendbar, wenn die essentiellen Wachstumsfaktoren im Überschuß vorhanden sind.

Der Grund für diese Voraussetzung wird aus folgender Gleichung von MONOD (1942) deutlich

$$\mu = \mu_{max} \left(\frac{s}{Ks + s} \right)$$

μ = spezifische Wachstumsrate

μ_{max} = maximale Wachstumsrate bei Substratsättigung

s = Substratkonzentration

Ks = Sättigungskonstante, entspricht der Substratkonzentration bei der $\mu = \frac{1}{2} \mu_{max}$ ist.

Die spezifische Wachstumsrate (μ) entspricht bei konstanter Substratkonzentration wie z.B. unter Bedingungen der kontinuierlichen Kultur der Substratkonzentration im Kulturmedium. In statischer Kultur kann, bedingt durch den Substratverbrauch ohne entsprechende Ergänzung, keine konstante Substratkonzentration aufrechterhalten werden. Als Folge verändert sich die Wachstumsrate im Bereich der Substratbegrenzung kontinuierlich und kann durch Messungen schwer erfaßt werden. Im Bereich der Substratsättigung ist $\mu = \mu_{max}$ und bleibt auch bei einer Abnahme der Substratkonzentration konstant. In den hier durchgeführten Versuchen war diese fast immer gegeben, doch wurden bei hohen Zelldichten deutliche Anzeichen für Substratbegrenzung beobachtet, auch wenn das Substrat nur zu 80 % erschöpft war.

Anstelle der Wachstumsrate wurde im folgenden als Wachstumsparameter die Verdopplungszeit t_d verwendet.

Die für einen Substratüberschuß erforderliche Substratkonzentration wurde mit Hilfe des Ertragskoeffizienten (Y) für Succinat (Y_S) ermittelt. Photoorganotroph im Fermenter gewachsener Rp. acidophila St. 7050 hatte ein Y_S von 0,56 (mg T.S./mg Na-Succ.). Wächst die Kultur bis zu einer Zelldichte von E = 2,0, so errechnet sich aus der Eichkurve in Abb.IV 2 eine Trockensubstanzkonzentration in der Kulturlösung von 0,76 mg/ml. Zur Bildung dieser Trockensubstanzkonzentration werden 0,76/0,56 = 1,35 mg Na-Succinat pro ml verbraucht. Der Nährlösung wurden in den Wachstumsversuchen 3,0 mg Na-Succinat/ml zugesetzt (s.Kap. II), so daß ein ausreichender Substratüberschuß vorhanden war.

Bei chemoorganotrophen Wachstum im Fermenter wurde für Rp. acidophila bei pO_2 159 Torr ein Y_S= 0,36 und bei pO_2 8,4 Torr ein Y_S= 0,304 für Na-Succinat ermittelt, so daß die Succinat-Menge für das Wachstum aerob im Dunkeln entsprechend erhöht werden mußte.

Für photoorganotrophes Wachstum im Fermenter ergaben sich bei braunen Rhodospirillen folgende Ertragskoeffizienten für Na-Succinat: R. fulvum Y_S= 0,43 und R. molischianum Y_S= 0,67. Die Ertragskoeffizienten für chemoorganotrophes Wachstum konnten wegen der aufwendigen pO_2-Regelung nicht in Vorversuchen bestimmt werden. Die für das mikroaerobe Wachstum notwendige Succinat-Menge wurde aus dem bei Rp. acidophila bestimmten Verhältnis Y_S anaerob-Licht/Y_S mikroaerob-Dunkel(1,55)berechnet.

Die Abhängigkeit des Protein- und Trockensubstanzgehaltes von der O.D. der Kulturlösung bei Rp. acidophila ist in Abb.IV 2 dargestellt. Mit diesen Eichkurven wurde die Berechnung des Protein-und T.S.-Gehaltes in Wachstumsabschnitten durchgeführt, in denen eine Bestimmung nicht möglich war.

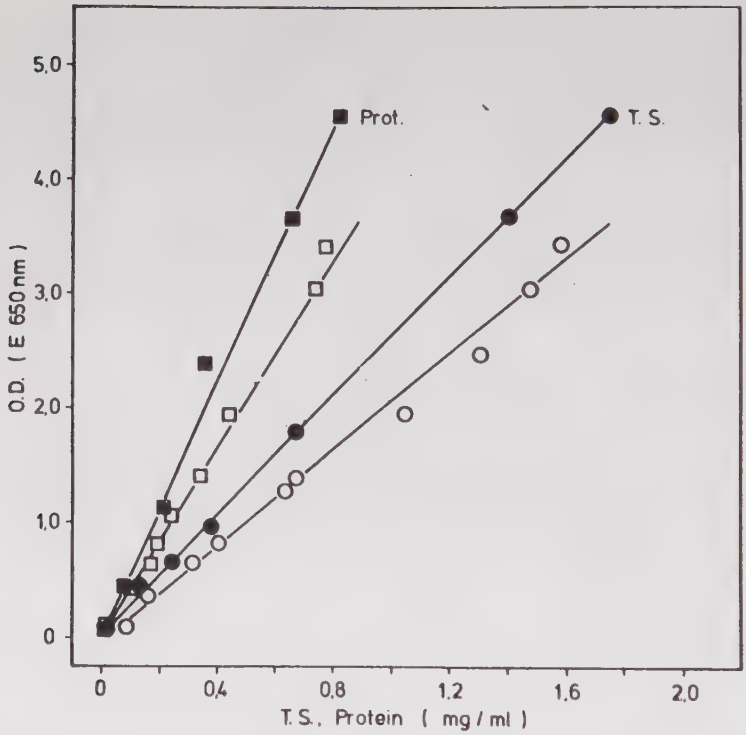


Abb.IV 2: Eichung der Trockensubstanz und des Proteingehaltes gegen die optische Dichte (O.D.), bei Rp.acidophila St. 7050.

Das Wachstum erfolgte anaerob im Licht (■ ●) oder aerob im Dunkeln (□ ○) im Fermenter unter Standardbedingungen. Die einzelnen Meßpunkte stellen Mittelwerte aus drei verschiedenen Fermenteransätzen dar.

□ ■ = Protein ○ ● = Trockensubstanz

Die Abbildung zeigt, daß das Verhältnis von Trockensubstanz zu Protein unter anaeroben Bedingungen im Licht wie unter aeroben Bedingungen im Dunkeln konstant ist; es hat für beide Bedingungen annähernd den gleichen Wert (2,1 bzw. 2,0). Der steilere Anstieg für anaerob im Licht gewachsene Kulturen geht darauf zurück, daß das Bchl auch im Absorptionsminimum bei der Trübungsmessung noch eine Restabsorption verursacht. Für die Darstellung wurden nur Werte aus Wachstumsphasen verwendet, in denen die Kulturbedingungen von Anfang an konstant gehalten wurden. Bei hohen Zelldichten und ungünstigen Wachstumsbedingungen wurde vielfach eine stärkere Zunahme der Trockensubstanz beobachtet, woraus auf Speicherstoffbildung geschlossen werden kann.

Für R. fulvum und R. molischianum wurde anaerob im Licht ebenfalls ein konstantes Verhältnis von Protein zu Trockensubstanz bestimmt (2,0 bzw. 1,7), wenn die O.D. nicht über E = 2,5 hinausging.

B. Fakultativ aerobe Rhodospirillaceae

Vorversuche

Ein aerobes Wachstum in Standkolben und Agarschrägröhrchen wurde von PFENNIG (1969) bei Rp. acidophila St. 7050, St. 7550 und St. 7750 gefunden. Diese Stämme und der neu isolierte Stamm 10350 zeigten auch ein gutes Wachstum in belüfteten und gerührten Erlenmeyerkolben im Dunkeln, jedoch bei Wachstum unter anaeroben Bedingungen im Licht trat bei sämtlichen Stämmen mit Ausnahme von St. 7050 ein starkes Wandwachstum auf. Aus diesem Grunde wurden die Versuche mit fakultativ aeroben

Rhodospirillaceae ausschließlich mit Rp. acidophila St. 7050 durchgeführt.

B 1. Wachstum anaerob im Licht

Die Bildungsrate der Photosynthesepigmente wird bei fakultativ aeroben Rhodospirillaceae durch die Beleuchtungsstärke und den pO_2 reguliert (COHEN-BAZIRE et al. 1957); aerob im Dunkeln können sie weitgehend pigmentfrei wachsen.

Dagegen vermögen braune Rhodospirillen aerob (mikroaerob) im Dunkeln nur voll pigmentiert zu wachsen, weil sie dazu nach der 1. Arbeitshypothese das photosynthetische Membransystem benötigen. In Anbetracht der Bedeutung des Pigmentgehaltes für das mikroaerobe Wachstum kann erwartet werden, daß die Regulation der Pigmentsynthese auf eine andere Weise erfolgt als in den fakultativ aeroben Arten. Unter diesem Gesichtspunkt könnte es interessant sein festzustellen, ob sich auch anaerob im Licht Unterschiede in der Regulation der Pigmentsynthese zwischen den beiden Rhodospirillaceen-Gruppen ergeben.

a) Schwachlicht

Das Wachstum von Rp. acidophila unter Schwachlichtbedingungen ist in Abb. IV 3 dargestellt. Das Wachstum wird in zweierlei Weise durch Licht begrenzt: 1. Durch die geringe vorgegebene Beleuchtungsstärke und 2. zusätzlich durch die zunehmende Selbstbeschattung der Zellen.

Die halblogarithmisch aufgetragene Kurve der Trübung (O.D.) zeigt den stärksten Anstieg am Anfang des Wachstumsversuches und nimmt dann mit zunehmender Dauer des Wachstums ab. Da die Beleuchtungsstärke bei Verfügbarkeit aller anderen Wachstumsfaktoren anaerob im Licht wachstumsbestimmend ist und sie über die gesamte Versuchszeit konstant bleibt, wird deutlich,

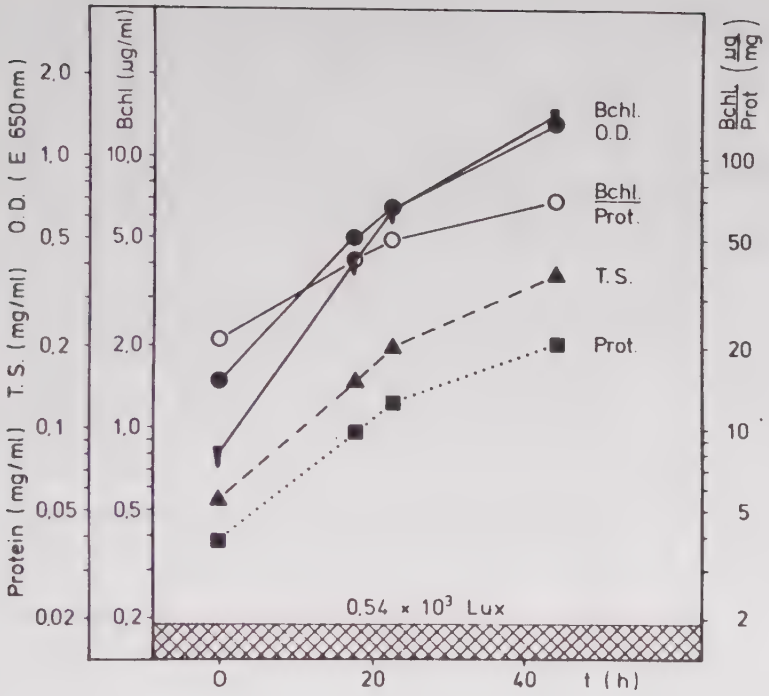


Abb.IV 3: Wachstum von Rp. acidophila St. 7050 anaerob im Schwachlicht.

Das Wachstum erfolgte im Fermenter unter Standardbedingungen, abweichend davon enthielt die Nährlösung 1,0 g Na-Succinat pro l. Kürzeste Verdopplungszeit der O.D. 10,1 h, des Bchl. 7,7 h und des Bchl./Prot. 18,4 h. Maximale Trübung E=1,32.

daß die Verringerung der Wachstumsgeschwindigkeit durch die Trübungszunahme bedingt ist. Eine Zunahme der Zellkonzentration bewirkt eine verstärkte Lichtstreuung u. Absorption, wodurch sich die Eindringtiefe des Lichtes in das Anzuchtgefäß verkleinert. Obwohl durch die Rührung im Fermentergefäß alle Zellen periodisch in den vollen Lichtgenuß kommen, nimmt die durchschnittliche Expositionszeit mit geringerer Eindringtiefe des Lichtes ab. Infolgedessen erhöhte sich die Verdopplungszeit von 10,1 h am Anfang auf 21 h gegen Ende des Versuches.

Außer der durchschnittlichen Expositionszeit gegenüber dem Licht ist die Anzahl der von der Zelle aufgenommenen Lichtquanten abhängig von der pro Zeiteinheit eingestrahlten Lichtmenge (welche der Beleuchtungsstärke entspricht) und der Aufnahmekapazität der Zellen, die wiederum vom Photosynthesepigmentgehalt bestimmt wird.

Dies wird aus einem zweiten, nicht dargestellten Wachstumsversuch besonders deutlich: Bei gleicher Beleuchtungsstärke und vergleichbarer Zelldichte, aber mit einem um 11 µg/mg höheren spezifischen Bacteriochlorophyllgehalt (Bchl./Prot.= 32 µg/mg) wie in den Zellen des Versuches in Abb.IV 3 hatte die Kultur zunächst eine um 4,2 h kürzere Verdopplungszeit (t_d = 5,9 h). Damit kommt hier die höhere photosynthetische Energiegewinnung durch vermehrte Absorption von Lichtquanten zur Wirkung.

Der spezifische Bacteriochlorophyllgehalt nahm von 21 auf 69 µg/mg am Ende des Versuches (Abb.IV 3) zu. Diese Erhöhung der Lichtabsorptionskapazität konnte offensichtlich nicht den geringer werdenden Lichtgenuß der Zellen voll kompensieren.

Die Regulation des spez. Bchl.-Gehaltes erfolgte durch eine unterschiedliche Bchl.-Syntheserate: Die Kurve für Bchl. zeigt am Anfang des Versuches einen stärkeren Anstieg (t_d Bchl.= 7,7 h) als die O.D. (t_d O.D. = 10,1 h), erreicht

etwa in der Mitte nach 20 h die Geschwindigkeit der O.D.-Zunahme und erhöhte sich dann weiterhin stärker als die Trübung. Der spez. Bchl.-Gehalt erreichte also nach 20 h Wachstumszeit einen Gleichgewichtspunkt, bei welchem sich der für die Beleuchtungsstärke und die vorhandene Zelldichte c h a r a k t e r i s t i s c h e spezifische Bacteriochlorophyllgehalt eingestellt hatte. Im Gleichgewichtspunkt erfolgte die Synthese des Bchl. mit gleicher Rate wie die der übrigen Zellbestandteile. Die weitere Abnahme der für die Zellen "e f f e k t i v e n B e l e u c h t u n g s s t ä r k e" (d.h. die auf die Zellen auftreffende Lichtmenge) veränderte den für 540 Lux charakteristischen "Sollwert" des spez. Bchl.-Gehaltes, wodurch der Bchl.-Regulationsmechanismus wieder eine vermehrte Bchl.-Synthese auslöste. Die gleiche Art der Photosynthesepigmentregulation anaerob im Licht konnte von COHEN-BAZIRE et al. (1957) für R. rubrum und Rp. sphaeroides festgestellt werden.

b) Starklicht

In diesem Experiment sollte eine sehr hohe Ausnutzung der Aufnahmekapazität für Lichtquanten erreicht werden, um damit den Zellen eine maximale photosynthetische Energiegewinnung zu ermöglichen. Daher wurde in dem in Abb.IV 4 aufgezeichneten Wachstumsversuch der Fermenter mit einer Vorkultur von sehr hohem spez. Bchl.-Gehalt beimpft und dann mit einer hohen Beleuchtungsstärke bestrahlt.

Als Folge verringerte sich der spez. Bchl.-Gehalt während der gesamten Versuchszeit, Protein und Trockensubstanz nahmen dagegen mit fast gleichbleibender Rate zu.

Der Verlauf der Kurve für den Bchl.-Gehalt der Kultur zeigt, daß die Synthese in den ersten 7 h des Versuchs vollkommen reprimiert war. Sie setzte erst ein, als der s p e z i f i s c h e Bacteriochlorophyllgehalt auf 20 µg/mg

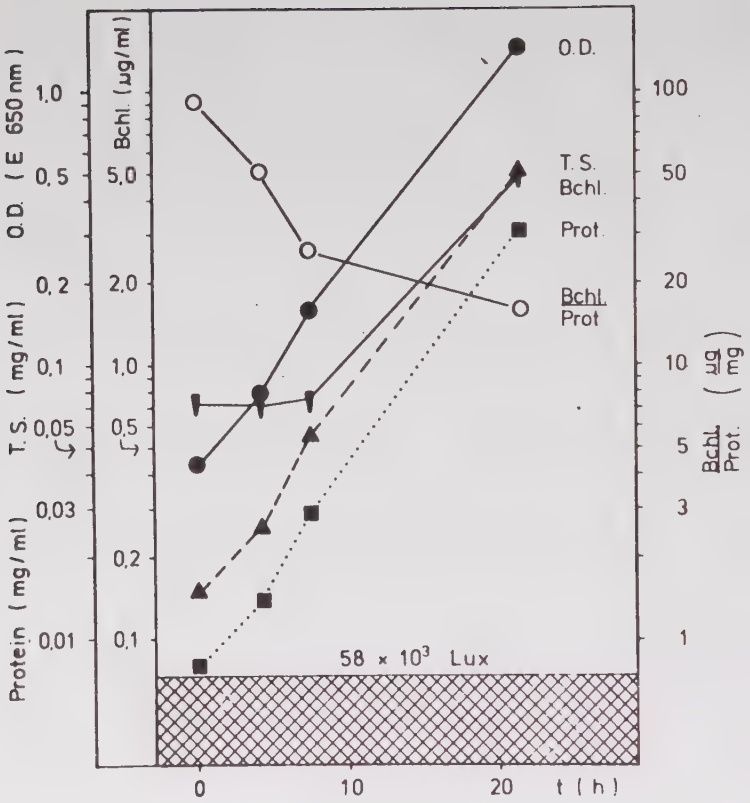


Abb.IV 4: Wachstum von Rp. acidophila St. 7050 anaerob im Starklicht.

Das Wachstum erfolgte im Fermenter unter Standardbedingungen, abweichend davon enthielt die Nährlösung 1,0 g Na-Succinat pro l. Spez. Bchl.-Gehalt der Vorkultur = 92 µg/mg. Kürzeste Verdopplungszeit der O.D. 3,3 h und des spez. Bchl.-Gehaltes -3,3 h.

abgesunken war (Anfangsgehalt 92 µg/mg), und sich damit dem charakteristischen Wert für die dann vorhandene "effektive Beleuchtungsstärke" näherte. Danach nahm das Bacteriochlorophyll mit etwas geringerer Rate als die O.D. zu, so daß gegen Versuchsende der Gleichgewichtspunkt erreicht war. Der spez. Bchl.-Gehalt blieb dann konstant (17 µg/mg).

Die kontinuierliche Abnahme des spez. Bchl.-Gehaltes bis Versuchsende zeigt, daß der spezifische Bchl.-Gehalt der Zellen größer war, als es der effektiven Beleuchtungsstärke entsprach. Folglich befanden sich die Zellen ständig im Bereich der Lichtsättigung, wodurch die Wachstumsgeschwindigkeit (t_d = 3,3 h) während des ganzen Versuches konstant blieb.

c) Zunehmende Lichtintensität

In den bisher beschriebenen Experimenten im Schwach- und Starklicht- bei gleichbleibender Beleuchtungsstärke - verursachte die Zunahme der Zelldichte während der Versuche eine kontinuierliche Änderung des spez. Bchl.-Gehaltes. Im folgenden Versuch sollte die Abnahme der für die Regulation des Bchl.-Gehaltes ausschlaggebenden "effektiven Beleuchtungsstärke" durch eine sukzessive Erhöhung der Lichtintensität kompensiert werden.

Abweichend von allen übrigen dargestellten Fermenterkulturen wurde in diesem Fall (Abb.IV 5) die Anzucht nicht bei 28°C, sondern in der ersten Beleuchtungsstufe bei 25°C und danach bei 18°C vorgenommen. Dies wirkte sich selbstverständlich auf die Wachstumsgeschwindigkeit und, wie noch zu erörtern sein wird, auch auf den Substratverbrauch aus.

Die Ergebnisse zeigen, daß trotz starker Zunahme der O.D. (von E = 0,32 auf E=5,30) der spez. Bchl.-Gehalt während des gesamten Versuchs weitgehend konstant blieb. In den ersten

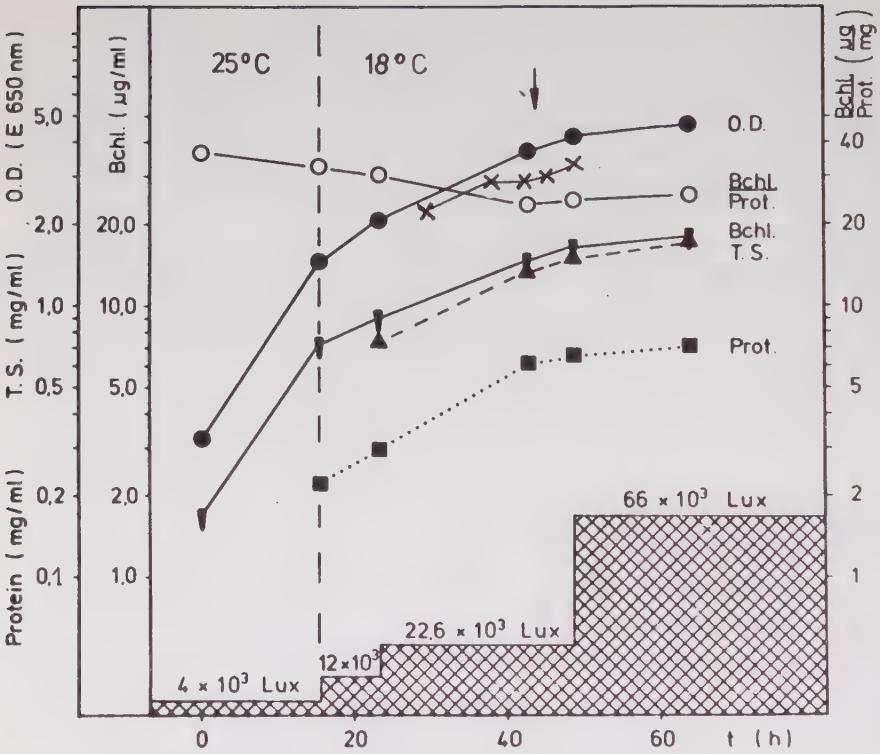


Abb.IV 5: Wachstum von Rp. acidophila St.7050 anaerob im Licht mit Erhöhung der Beleuchtungsstärke entsprechend der Trübungszunahme.

Das Wachstum erfolgte im Fermenter unter Standardbedingungen, abweichend davon wurde der Ansatz mit den in der Abb. angegebenen Temperaturen gefahren. An der mit einem Pfeil bezeichneten Stelle wurden 10 g Na-Succinat zugegeben. Die mit der kontinuierlichen Trübungsmessung berechnete kürzeste Verdopplungszeit war für 25°C = 7,3 h und für 18°C = 14,9 h. Maximale Trübung $E_{=}5,3$.

x ——— x = Kontinuierliche Trübungsmessung bei 691 nm.

40 h Wachstumszeit fand jedoch eine geringe Abnahme des spez. Bchl.-Gehaltes statt (von 36,4 auf 25,9 µg/mg), was deutlich macht, daß der vorhandene spez. Bchl.-Gehalt größer war als es dem jeweiligen Lichtgenuß der Zellen entsprach, d.h. die Zellen befanden sich im Bereich der Lichtsättigung.

Das Wachstum, das bei ungestörten Bedingungen unter den gegebenen Beleuchtungsverhältnissen hätte konstant sein müssen, verlangsamte sich von t_d= 7,3 h auf 14,9h nach der Temperaturabsenkung. Nach ca. 38 h trat, wie die kontinuierliche Trübungsmessung zeigt, ein vollständiger Wachstumsstillstand ein, der auf eine Erschöpfung des Substrats zurückgeführt werden muß: Nach Zugabe von Succinat setzte das Wachstum wieder ein. Die zur Zeit des Stillstands vorliegende Zelldichte ließ nach den Messungen in den Versuchen bei 28°C noch keinen vollständigen Substratverbrauch erwarten, was darauf schließen läßt, daß der Zellertrag bei niedriger Temperatur geringer ist. Nach der Zugabe von 1 g Na-Succinat/l erhöhte sich der T.S.-Gehalt um 0,45 mg/ml, so daß sich für die Wachstumstemperatur von 18°C (Y_S= 0,45) ein um 20 % höherer Substratverbrauch ergibt als für 28°C (Y_S=0,56).

Die Verlängerung der Verdopplungszeit bei Verringerung der Wachstumstemperatur zeigte sich auch in weiteren Versuchen; unter vergleichbaren Bedingungen wurden folgende Verdopplungszeiten erzielt:

Temperatur	28°C	t_d O.D.	4,5 h
"	25°C	"	7,3 h
"	18°C	"	14,9 h

In anderen, nicht dargestellten Versuchen wurde mit einer stufenweisen Erhöhung der Beleuchtungsstärke und Substratüberschuß eine konstante Wachstumsgeschwindigkeit und ein gleichbleibender spez. Bchl.-Gehalt erzielt.

B 2. Wachstum aerob im Dunkeln

Nach den von DREWS et al. (1969) durchgeführten Versuchen mit der fakultativ aeroben Rhodospirillaceen-Art Rp. capsulata zeigte die Wachstumsgeschwindigkeit im pO_2-Bereich von 4-100 Torr keine größeren Unterschiede, aber bei pO_2 150-160 Torr war die Wachstumsrate um 10 % reduziert. Der spez. Bchl.-Gehalt änderte sich im pO_2-Bereich von 20-100 Torr nur unwesentlich.

Bei Rp. acidophila konnte aufgrund der Vorversuche eine ähnliche Auswirkung des pO_2 auf die Wachstumsgeschwindigkeit und den spezifischen Bacteriochlorophyllgehalt erwartet werden.

Der nun folgende Versuch bei hohem pO_2 und die weiteren bei niedrigerem pO_2 sollten zeigen, wie bei Rp. acidophila die Wachstumsgeschwindigkeit und die Regulation der Bchl.-Synthese durch den Sauerstoffpartialdruck beeinflußt wird und Vergleiche mit den fakultativ mikroaeroben Rhodospirillen möglich machen.

a) pO_2 159 und 75 Torr (Abb. IV 6)

Der Einfluß des pO_2 auf die Bchl.-Regulation von Rp. acidophila wird in diesem Versuch an der unterschiedlichen Auswirkung der zwei pO_2-Phasen auf den spez. Bchl.-Gehalt sichtbar. In der ersten Phase mit atmosphärischem pO_2 (159 Torr) nahm der spez. Bchl.-Gehalt ab und zwar von 4,2 µg/mg am Anfang auf 1,8 µg/mg am Ende.

Nach Herabsetzung des pO_2 auf 75 Torr stieg der spez. Bchl. im Laufe von 6 h auf 2,4 µg/mg an und blieb dann bis zum Ende des Versuches konstant. Hier hatte sich offenbar der für diesen pO_2 charakteristische Bchl.-Gehalt eingestellt, ähnlich wie auch für eine bestimmte effektive Beleuchtungsstärke ein charakteristischer Bchl.-Gehalt gefunden wurde.

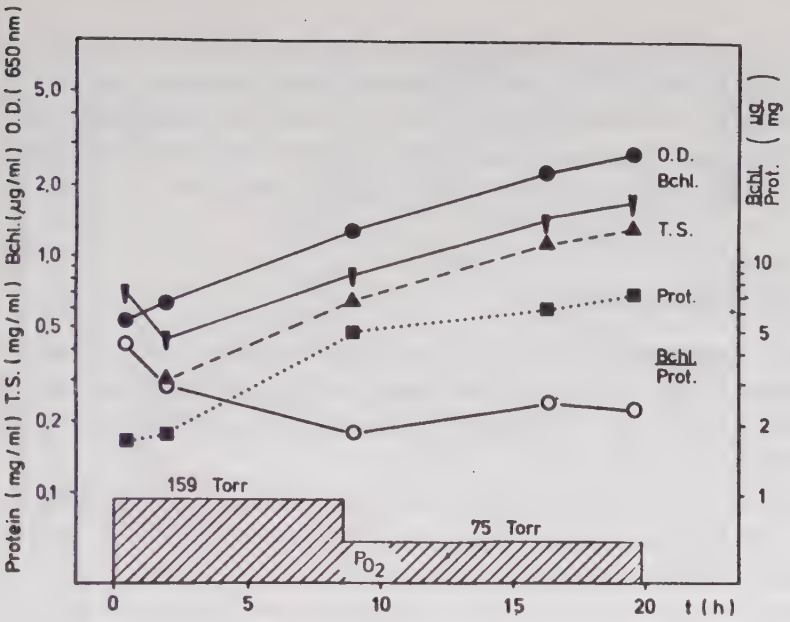


Abb.IV 6: Abhängigkeit des spez. Bchl.-Gehaltes (Bchl./Prot.) bei Rp. acidophila St. 7050 vom pO_2.

Das Wachstum erfolgte im Fermenter unter Standardbedingungen aerob im Dunkeln, abweichend davon enthielt die Nährlösung 4 g Na-Succinat und 1 g NH_4Cl pro l. Die Vorkultur stammte aus dem in Abb.IV 10 dargestellten Versuch und hatte einen spez. Bchl.-Gehalt von 4,5 µg/mg. Trockensubstanzgehalt bei O.D. 2,7 = 1,34 mg/ml.

Mit der Herabsetzung des pO_2 von 195 auf 75 Torr veränderte sich auch die Wachstumsgeschwindigkeit: Die Verdopplungszeit verlängerte sich von 6,0 h auf 9,2 h. (Diese Verlängerung der t_d ist nicht nur auf die Änderung des pO_2 zurückzuführen, sondern im letzten Teil durch Substratmangel bedingt).

b) pO_2 50 Torr (Abb.IV 7)

In diesem Experiment sollte geprüft werden, ob bei längerem Wachstum bei konstantem pO_2 die Wachstumsgeschwindigkeit unverändert bleibt und sich ein konstanter spez. Bchl.-Gehalt einstellt.

Der nahezu gleichmäßige Anstieg des Logarithmus der Trübung zeigt, daß über einen Zeitraum von 50 h eine fast unveränderte Wachstumsgeschwindigkeit beibehalten wurde. (Das Ende des Wachstums war mit einer verstärkten Schleimbildung verbunden, so daß hier eine Begrenzung des Wachstums durch die Stickstoffquelle wahrscheinlich ist).

Die über einen längeren Zeitraum aufrechterhaltene Wachstumsgeschwindigkeit von t_d 7,4 h kann als charakteristischer Wert für den pO_2 von 50 Torr angesehen werden. Aus dem Vergleich mit der Wachstumsgeschwindigkeit bei pO_2 159 Torr (t_d 6,0 h) wird deutlich, daß bei pO_2 50 Torr das Wachstum bereits durch Sauerstoff limitiert ist. Bei Rp. capsulata wird das Wachstum in genau entgegengesetzter Weise reguliert (DREWS et al.1969): Hier verursacht der höhere Sauerstoffpartialdruck (150-160 Torr) einen Rückgang der Wachstumsrate, während sich in dem darunterliegenden Bereich (pO_2 4-100 Torr) die Wachstumsgeschwindigkeit kaum verändert.

Der spezifische Bacteriochlorophyllgehalt verringerte sich nur in den ersten Stunden des Versuches (von 15,9 auf 3,7 µg/mg) und blieb dann bis zum Wachstumsstillstand konstant.* Wie un-

*Die in Abb.IV 7 sichtbaren Schwankungen des Bchl.-Protein- und T.S.-Gehalts sind auf einen erhöhten Schleimgehalt zurückzuführen, der ein quantitatives Abernten der Zellen nicht immer gewährleistete.

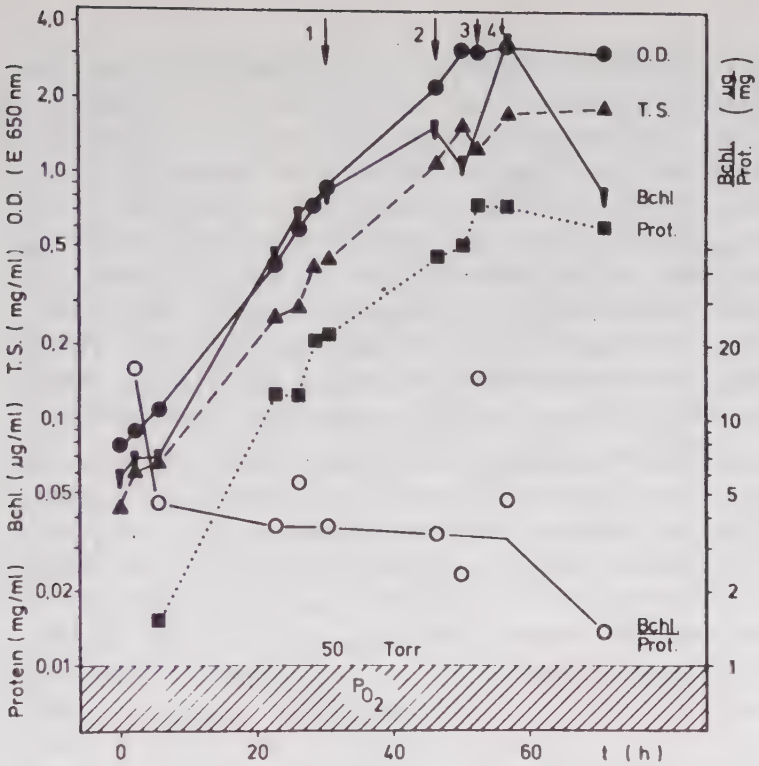


Abb.IV 7: Wachstum und Bchl.-Synthese von Rp. acidophila St. 7050 bei einem pO_2 von 50 Torr im Dunkeln.

Das Wachstum erfolgte im Fermenter unter Standardbedingungen. Maximale Trübung E 650 nm = 3,24. Kürzeste Verdopplungszeit der O.D. 7,4 h. An den mit Pfeilen bezeichneten Stellen wurden folgende Substratmengen zugegeben:
1, 2 u. 4 = 20 g Na-Succinat
3 = 10 g Na-Succinat

ter phototrophen Bedingungen stellt sich auch hier ein spez. Bchl.-Gehalt ein, der für den bestimmenden Faktor charakteristisch ist. Bei der phototrophen Kultur kann ein bestimmter spez. Bchl.-Gehalt nur durch laufende Zunahme der Beleuchtungsstärke aufrechterhalten werden, so daß die für die Zellen effektive Beleuchtungsstärke unverändert bleibt. Eine Konstanthaltung des pO_2 schließt eine ständige Erhöhung der Sauerstoff-Begasungsrate mit steigendem Bedarf bereits mit ein, so daß eine Konstanthaltung des pO_2 nicht einer gleichbleibenden äußeren Beleuchtungsstärke, sondern einer Aufrechterhaltung der effektiven Beleuchtungsstärke gleichkommt.

Im vorigen Versuch nahm der spez. Bchl.-Gehalt bei Verringerung des pO_2 von 159 auf 75 Torr um 0,6 µg/mg zu, das sind $0{,}7 \cdot 10^{-2}$ µg/mg je Torr. Die weitere Absenkung des pO_2 auf 50 Torr in diesem Versuch ergab gegenüber 75 Torr im vorigen Versuch eine Erhöhung von 1,3 µg/mg, das sind $5{,}2 \cdot 10^{-2}$ µg/mg je Torr. Die Zunahme des Bchl.-Gehaltes mit dem pO_2 ist also im Bereich von 159 bis 50 Torr relativ gering. Sie stimmt mit dem Befund an Rp. capsulata (Drews et al.) überein, wo in diesem pO_2-Bereich ebenfalls eine schwache Veränderung des spez. Bchl.-Gehaltes bei abnehmendem pO_2 stattfand.

c) pO_2 30 - 4,2 Torr (Abb.IV 8, Tab.IV 1)

In den beiden vorangegangenen Experimenten wurde der Einfluß des Sauerstoffs bei hohem pO_2 auf Wachstum und Regulation des Bchl.-Gehaltes untersucht. Um Vergleiche mit fakultativ mikroaeroben Arten zu ermöglichen, wurde in diesem Versuch die Wirkung des Sauerstoffs durch stufenweise Absenkung des pO_2 von 30 auf 4,2 Torr geprüft. Im darauffolgenden Versuch wurde der pO_2 schließlich für längere Zeit bei 8,4 Torr konstant gehalten.

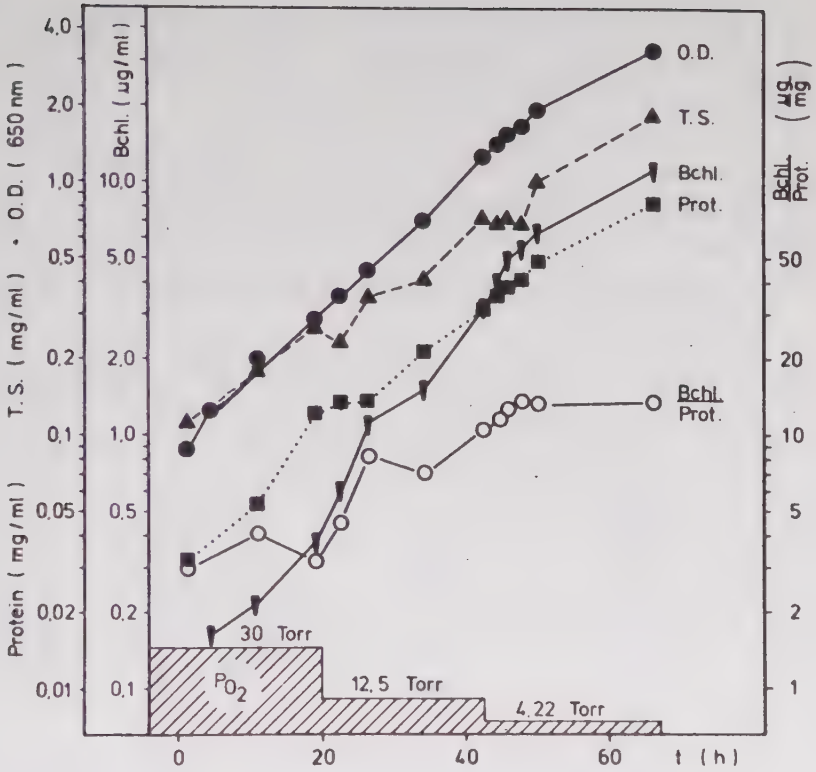


Abb.IV 8: Abhängigkeit des spez. Bchl.-Gehaltes vom pO_2, mikroaerob im Dunkeln, bei Rp. acidophila St.7050.

Das Wachstum erfolgte im Fermenter unter Standardbedingungen, abweichend davon enthielt die Nährlösung 5 g Na-Succinat, 1,5 g NH_4Cl und 1,5 ml SL6pro 1. Es wurde mit 10 % einer aeroben Vorkultur (aus Versuch Abb.IV 6, pO_2* = 75 Torr) beimpft, dann der Fermenter 1 h mit pO_2 = 84 Torr gefahren und zur Zeit t = 0 (h) auf pO_2 = 30 Torr umgeschaltet.

Weitere Wachstumsparameter in Tab.IV 1.

Wie die beiden vorigen Experimente erwarten ließen, steigt der spez. Bchl.-Gehalt mit weiterer Absenkung des Sauerstoffpartialdrucks an. Nach Umschaltung vom höheren auf den niedrigeren pO_2 nahm die Bchl.-Syntheserate solange zu, bis ein Gleichgewichtspunkt erreicht wurde, dann verlief sie parallel zur Syntheserate der übrigen Zellbestandteile, so daß der spez. Bchl.-Gehalt dann konstant blieb. Die für die eingestellten Sauerstoffpartialdrücke charakteristischen spez. Bchl.-Gehalte (Tab.IV 1) zeigen eine stärkere Zunahme

Tab.IV 1: Einfluß des Sauerstoffpartialdruckes (pO_2) auf den spez. Bchl.-Gehalt (Bchl./Prot.) und die Verdopplungszeiten für Trockensubstanz und Protein.

pO_2 (Torr)	$\frac{\text{Bchl.}}{\text{Prot.}}$ $\left(\frac{\mu g}{mg}\right)$	t_d T.S. (h)	t_d Prot. (h)
30,0	3,4	13,9	6,2
12,5	8,6	15,6	6,8
4,2	13,5	16,4	12,9

Die Meßwerte stammen aus dem Wachstumsversuch aerob im Licht in Abb.IV 8. Die t_d T.S. und t_d Prot. wurden jeweils 2 h nach Umschaltung auf die neue pO_2-Phase berechnet. Der spez. Bchl.-Gehalt wurde nach Erreichen des Gleichgewichtspunktes (s.Text) ermittelt, die Werte stellen Mittelwerte aus drei Messungen dar.

mit absinkendem pO_2 als in den beiden vorangegangenen Versuchen mit höherem pO_2. Im folgenden sind die Bchl.-Zunahmeraten je Torr unter aeroben Bedingungen zusammengestellt:

Abnahme des pO_2 (Torr)	Zunahmerate des spez. Bchl.-Gehaltes ($\mu g/mg \cdot Torr^{-1}$)
159 - 75	$0,7 \cdot 10^{-2}$
75 - 50	$5,2 \cdot 10^{-2}$
30 - 12,5	$29,7 \cdot 10^{-2}$
12,5- 4,2	$59,0 \cdot 10^{-2}$

Eine sprunghafte Zunahme des Bchl.-Gehaltes unterhalb von pO_2 20-30 Torr scheint für die fakultativ aeroben Rhodopseudomonas-Arten charakteristisch zu sein; sie wurde auch von DREWS et al. (1969) bei Rp. capsulata gefunden.

Betrachtet man die Verdopplungszeiten für Protein und T.S. in Tab. IV 1, so zeigt sich, daß die Wachstumsgeschwindigkeit von Stufe zu Stufe geringer wird und in diesem Bereich gegenüber pO_2 50 Torr stark abfällt. Dieses Verhalten von Rp. acidophila stimmt nicht mit dem von Rp. capsulata überein, wo sich die Verdopplungszeit zwischen pO_2 4-100 Torr kaum veränderte (DREWS et al.1969).

d) pO_2 8,4 Torr und anaerob (Abb. IV 9, Tab.IV 2)

Für den Vergleich des mikroaeroben Wachstums brauner Rhodospirillen war es notwendig, auch Rp. acidophila über einen längeren Zeitraum bei einem konstant niedrigen pO_2 wachsen zu lassen. Durch Einschaltung anaerober Phasen sollte festgestellt werden, ob Rp. acidophila unter Gärungsbedingungen zur Bildung von Zellsubstanz fähig ist. Dies ist wichtig,um auszuschließen, daß unter mikroaeroben Bedingungen Gärungsprozesse am Wachstum beteiligt sind, so daß dieses nicht allein auf oxidative Energiegewinnung zurückzuführen wäre.

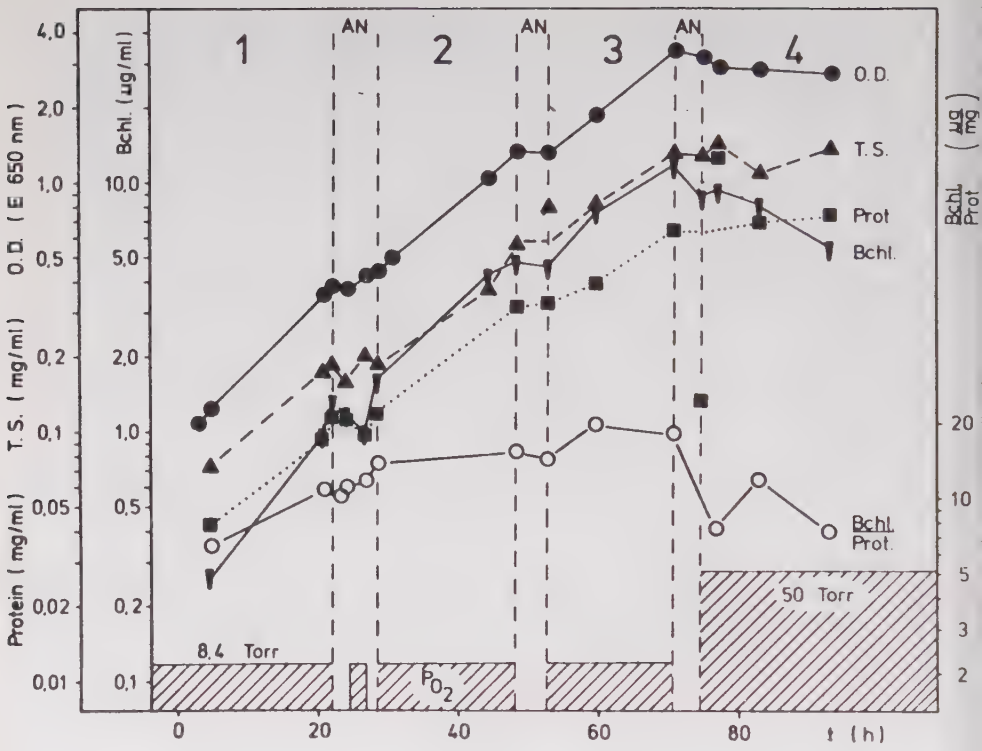


Abb.IV 9: Mikroaerobes, aerobes und anaerobes Wachstum im Dunkeln bei Rp.acidophila St.7050.

In den mit gestrichelten Linien begrenzten Wachstumsabschnitten wurde auf anaerob-Dunkel (AN) umgeschaltet. Das Wachstum erfolgte im Fermenter unter Standardbedingungen, abweichend davon enthielt die Nährlösung 5 g Na-Succinat/l und 1,5 g NH_4Cl/l. Das Impfmaterial wurde mikroaerob im Dunkeln bei pO_2 4,2 Torr angezogen (Abb.IV 8). Maximaler spez. Bchl.-Gehalt Bchl./Prot. = 18,7 µg/mg. Darstellung weiterer Wachstumsparameter in Tab. IV 2.

Der Wachstumsversuch umfaßte vier mikroaerobe Wachstumsabschnitte von je 20 h Wachstumszeit, welche durch 3 anaerobe Abschnitte voneinander getrennt sind (in Abb.IV 9 durch gestrichelte Linien gekennzeichnet).

Der spezifische Bacteriochlorophyllgehalt nahm bis zum dritten mikroaeroben Abschnitt zu. Im Abschnitt 4, in dem das Wachstum zum Stillstand kam, war eine deutliche Abnahme festzustellen.

Die Zunahme des spez. Bchl.-Gehaltes innerhalb der mikroaeroben Phasen erfolgte nicht gleichmäßig: jeweils nach Umschaltung von anaeroben auf mikroaerobe Wachstumsbedingungen nahm die Bchl.-Syntheserate plötzlich für kurze Zeit zu, so daß der spez. Bchl.-Gehalt ebenfalls anstieg. Danach blieb der spez. Bchl.-Gehalt entweder konstant (Absch.2) oder nahm leicht ab (Absch.3). Offensichtlich kann die Bchl.-Synthese anaerob im Dunkeln induziert werden, jedoch erst einsetzen, wenn die für die Synthese nötige Energie zur Verfügung gestellt wird.

Der charakteristische spez. Bchl.-Wert für pO_2 8,4 Torr wurde in Abschnitt 2 mit 14,3 µg/mg erreicht. Die durch die anaerobe Vorphase ausgelöste Bchl.-Synthese führte in Abschnitt 3 bemerkenswerterweise zu einer Überschreitung des charakteristischen Wertes.

In den anaeroben Bereichen fand kein Wachstum statt, so daß eine zum Wachstum führende Vergärung von Reservestoffen ausgeschlossen werden kann. Im 4. Abschnitt war das Substrat, wie die Trübungskurve zeigt, offenbar erschöpft. Dies ermöglicht,den Ertragskoeffizienten (Y_S) für Na-Succinat für die hier gewählten mikroaeroben Wachstumsbedingungen zu berechnen:

$$Y_S = \frac{1{,}52 \text{ mg T.S.}}{5{,}00 \text{ mg Na-Succ.}} = 0{,}304$$

Daß der Ertragskoeffizient bei pO_2 8,4 Torr geringer ist als bei pO_2 159 Torr (Y_S = 0,36), läßt sich durch den höheren Ener-

giebedarf bei langsamer Wachstumsgeschwindigkeit erklären und geht wohl auch auf den Bedarf für die Bchl.-Synthese zurück.

Der Versuch zeigt, daß Rp. acidophila ein andauerndes Wachstum unter mikroaeroben Bedingungen durchführen kann: die Verdopplungszeit für Trockensubstanz von 12,3 h (Tab.IV 2) blieb über einen Zeitraum von 50 h konstant. Tabelle IV 2 zeigt auch, daß im Wachstumsabschnitt 2 die Verdopplungszeiten für T.S., Bchl. und Protein fast gleich waren, eine Bestätigung, daß der dort erreichte spez. Bchl.-Gehalt einen konstanten und darum charakteristischen Wert für den pO_2 von 8,4 Torr erreicht hatte. Dieser spez. Bchl.-Gehalt stellte sich erst nach 20 h Wachstumszeit ein. Ähnliche Zeitspannen wurden auch bei braunen Rhodospirillen (Kap. IV C 4) festgestellt.

Tab.IV 2: Auswirkung des pO_2 auf die Bildungsrate von Zellbestandteilen bei Rp. acidophila St. 7050.

Wachstumsabschnitte in Abb.IV 9	Wachstumszeit (h)	Bchl./Prot. (µg/mg)	t_d T.S. (h)	t_d Bchl. (h)	t_d Prot. (h)
1	20	11,3	12,5	8,5	11,9
2	40	14,3	12,3	12,4	13,7
3	70	18,7	15,3	17,7	15,1

Die Meßwerte sind dem Versuch in Abb.IV 9 entnommen. Das Wachstum erfolgte aerob im Dunkeln bei pO_2 8,4 Torr.

Erwähnenswert in Wachstumsabschnitt 4 ist, daß der Wachstumsstillstand durch Substratmangel einen Abbau von Bacteriochlorophyll bewirkte. Siehe auch den Bchl.-Abbau, der bei braunen Rhodospirillen mikroaerob im Dunkeln (Kap. C 4) mehrfach gefunden wurde.

B 3. Verhalten beim Übergang von anaerob-Licht auf aerob-Dunkel.

Bei Rp. acidophila ist das Wachstum aerob im Dunkeln erheblich langsamer als anaerob im Licht bei Lichtsättigung (t_d 6,0 bzw. 3,3 h, vergl. Versuch B 2 a mit B 1 b). Offensichtlich läuft hier die oxidative Energiegewinnung bei einer geringeren Rate ab als die photosynthetische. Im Gegensatz dazu stehen die Befunde von DREWS et al. (1969), die bei Rp. capsulata aerob im Dunkeln Verdopplungszeiten für Protein feststellten (2,5 - 2,75 h), die etwa denen bei phototrophem Wachstum entsprechen. Da diese Frage für die Untersuchung des Elektronentransportsystems von Bedeutung ist (Kap. V 4), erschien es wünschenswert, den Befund an Rp. acidophila in ein und demselben Versuch zu verifizieren.

Die bisherigen Versuche mit Rp. acidophila erlauben keine eindeutige Aussage darüber, wie sich die Zellen an aerobe Bedingungen anpassen, wenn das photosynthetische System zur Energiegewinnung voll ausgebildet ist. Im folgenden Versuch soll dies durch den Übergang von Wachstumsbedingungen anaerob im Licht auf solche aerob im Dunkeln (bei hohem pO_2) geklärt werden.

Der in Abb. IV 10 dargestellte Wachstumsversuch ist in zwei Wachstumsabschnitte mit den beschriebenen Bedingungen unterteilt. Wie zu erwarten war, nahm die Wachstumsgeschwindigkeit nach der Umschaltung von anaerob-Licht auf aerob-Dunkel ab. Die Verlängerung der Verdopplungszeit von 4,6 auf 7,8 h ist etwas geringer, als es nach den Versuchen B2a und B16 zu erwarten war, was auf eine gewisse Lichtbegrenzung in der anaeroben Lichtphase dieses Versuches schließen läßt.

Die Änderung der Wachstumsgeschwindigkeit bestätigt, daß Rp. acidophila eine vollständige Anpassung an oxidative Energiegewinnung nicht vollziehen kann, daher mit oxidativer Energiegewinnung nicht den gleichen Energiebetrag wie bei photosynthetischer Energiegewinnung bereitstellen kann. Dies zeigt

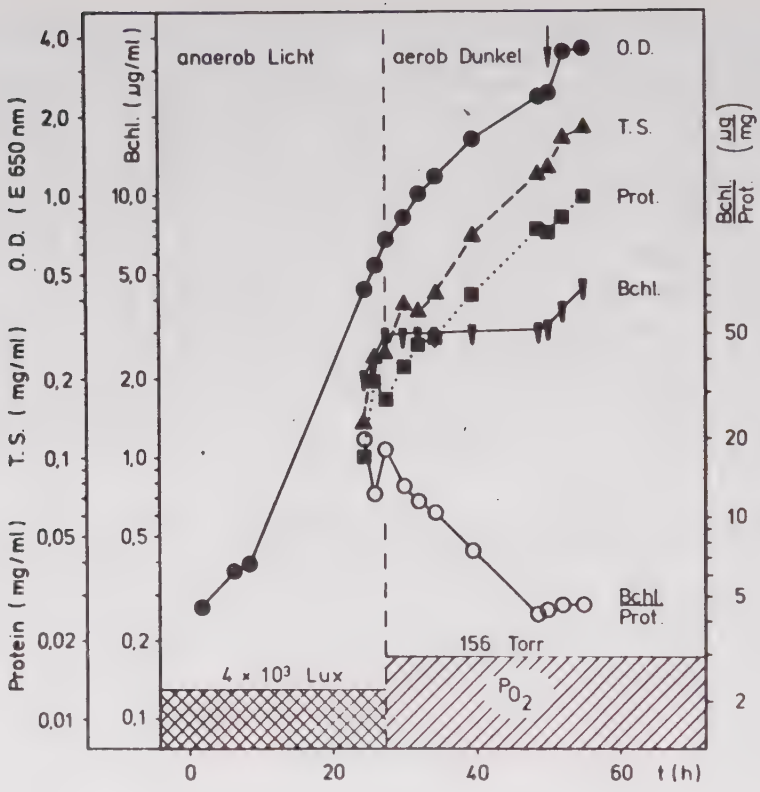


Abb. IV 10: Wachstum von Rp. acidophila St. 7050 anaerob im Licht und aerob im Dunkeln.

Das Wachstum erfolgte im Fermenter unter Standardbedingungen, abweichend davon enthielt die Nährlösung 4 g Na-Succinat/l. An der mit einem Pfeil bezeichneten Stelle wurden 10 g Na-Succinat zugegeben, das Substrat war schon 4 h davor erschöpft. Nach Umschaltung auf aerob-Dunkel Schleimbildung. Verdopplungszeit vor Umschaltung = 4,6 h und nach Umschaltung = 7,8 h.

= Beleuchtungsstärke

sich auch in der Beobachtung, daß bei einem pO_2 oberhalb von 160 Torr die Wachstumsgeschwindigkeit wieder abnimmt. Eine gewisse Empfindlichkeit gegen Sauerstoff wurde auch im pO_2-Bereich von 159-120 Torr festgestellt: In Fermenteransätzen, die mit einer sehr geringen Menge Vorkultur beimpft wurden, kam kein Wachstum zustande. Daß die Zellen dabei nicht irreversibel geschädigt waren, zeigte sich darin, daß nach Absenkung des pO_2 das Wachstum wieder einsetzte. Nach einer bestimmten Zellvermehrung konnte der pO_2 dann wieder erhöht werden. Ein ähnliches Verhalten wurde auch bei R. rubrum beobachtet.

Die Umschaltung auf den aeroben Bereich fand bei einem spez. Bchl.-Gehalt von 17,8 µg/mg statt, welcher den für pO_2 159 Torr charakteristischen Wert (1-2 µg/mg) bei weitem übertraf. Sofort nach Umschaltung wurde die Bchl.-Synthese völlig reprimiert; durch das weiter andauernde Wachstum verdünnte sich das Bchl. in den Zellen aus, und die Kurve für den spez. Bchl.-Gehalt nahm kontinuierlich ab.

Gegen Ende des Versuches setzte die Bchl.-Synthese plötzlich wieder ein, wodurch der spez. Bchl.-Gehalt bei einem Wert von 4,3 µg/mg konstant blieb und nicht den für pO_2 159 Torr charakteristischen Sollwert von 1-2 µg/mg erreichte.

Wie die kontinuierliche Trübungsmessung zeigte (in Abb.IV 10 nicht dargestellt), war das Wachstum gegen Ende der Bchl.-Repression zum Stillstand gekommen. Die Zugabe von Succinat (Pfeil) löste dann mit erneutem Wachstum auch die Bchl.-Synthese aus. Dies ist ein weiteres Beispiel dafür, daß die Bildung von Bchl. durch Mangelbedingungen, unabhängig von Lichtintensität und Sauerstoffpartialdruck, induziert werden kann, aber erst wirksam wird, wenn Bedingungen für eine erneute Gewinnung von Energie geschaffen wurden (s.S.97).

Nach der Umschaltung auf aerobe Wachstumsbedingungen setzte eine Schleimbildung ein, die vermutlich einen überhöhten Substratverbrauch verursachte und so den durch Substratmangel be-

dingten Wachstumsstillstand erklärt, obwohl nach der Berechnung über Y_S erst 66 % des Succinats verbraucht waren. Später konnte die Schleimbildung durch Verwendung von Vorkulturen aus schleimarmen Kolonien weitgehend verhindert werden.

B 4. Elektronenoptische Untersuchungen

OELZE & DREWS (1972) berichteten, daß intracytoplasmatische Membranen bei Rhodospirillaceae aerob im Dunkeln nur bei sehr niedrigem pO_2 gebildet werden; eine Ausnahme scheint Rp. capsulata zu sein, welcher bei pO_2 150 Torr intracytoplasmatische Membranen bildete, die jedoch mehr der cytoplasmatischen Membran als den "Thylakoiden" entsprechen dürften (DREWS et al. 1969).

Die Feinstruktur von Rp. acidophila wurde von TAUSCHEL & HOENIGER (1974) untersucht; auf strukturelle Unterschiede anaerob im Dunkeln und aerob im Licht kultivierter Zellen wurde nicht eingegangen.

Untersuchungen der Feinstruktur von aerob im Dunkeln gewachsenen Zellen von Rp.acidophila St.7050 wurden in Zusammenarbeit mit F. MAYER (Institut für Mikrobiologie, Univ. Göttingen) durchgeführt.

Ultradünnschnitte von aerob im Dunkeln kultivierten Zellen bei pO_2 8,4 Torr, 50 Torr und 159 Torr zeigten eine vom pO_2 abhängige Bildung intracytoplasmatischer Membranen. In Zellen, die bei pO_2 159 Torr angezogen wurden, konnten keine intracytoplasmatischen Membranen gefunden werden. Die Kulturen bei pO_2 8,4 Torr hatten ein mit anaerob im Licht gewachsenen Zellen vergleichbares Membransystem, bei pO_2 50 Torr gewachsenen Zellen hatte sich das intracytoplasmatische Membransystem stark verringert gegenüber Zellen, die bei pO_2 8,4 Torr gewachsen waren.

C. Fakultativ mikroaerobe Rhodospirillaceae

Vorversuche

Die Aufklärung der Wachstumsphysiologie des mikroaeroben Wachstums stellt das Hauptziel dieser Versuchsreihe dar. Aus diesem Grund wurden in einfachen Vorversuchen verschiedene Stämme brauner Rhodospirillen auf mikroaerobes Wachstum in Flüssigkulturen geprüft. Mikroaerobe Bedingungen wurden dabei durch Zugabe des Reduktionsmittels Thioglycolat hergestellt.

Die Vorversuche wurden in ungeschüttelten Erlenmeyerkolben mit und ohne Thioglycolat durchgeführt, und zwar mit folgenden Stämmen: R.fulvum St. 10060 und St.147, R.molischianum St.N 131 und St.6960 und R.photometricum St.N 132 und St.2160. Stellvertretend für alle diese Stämme sind in Abb.IV 11 die Versuchsergebnisse mit R.molischianum dargestellt. Nur bei Zugabe von Na-Thioglycolat konnten in den dem atmosphärischen pO_2 ausgesetzten Standkulturen etwa 1,5 Verdopplungen der O.D. erreicht werden. Ohne Thioglycolat fand kein nennenswertes Wachstum statt.

Vergleicht man die drei Arten der braunen Rhodospirillen, so war bei R.fulvum der größte, bei R.photometricum der geringste Zuwachs festzustellen, R.molischianum lag dazwischen. Die Zellen waren voll pigmentiert wie anaerob im Licht gewachsene Zellen. Für die Hauptversuche wurden die Stämme ausgewählt, die in diesem Versuch das beste Wachstum gezeigt hatten, nämlich R.fulvum St.10060, R.molischianum St.N 131 und R.photometricum St.N 132.

C 1. Wachstum anaerob im Licht

Diese Versuche hatten das Ziel, die Regulation des spezifischen Bacteriochlorophyllgehaltes und der Wachstumsgeschwindigkeit in Abhängigkeit von der Beleuchtungsstärke bei den braunen Rhodospirillen festzustellen.

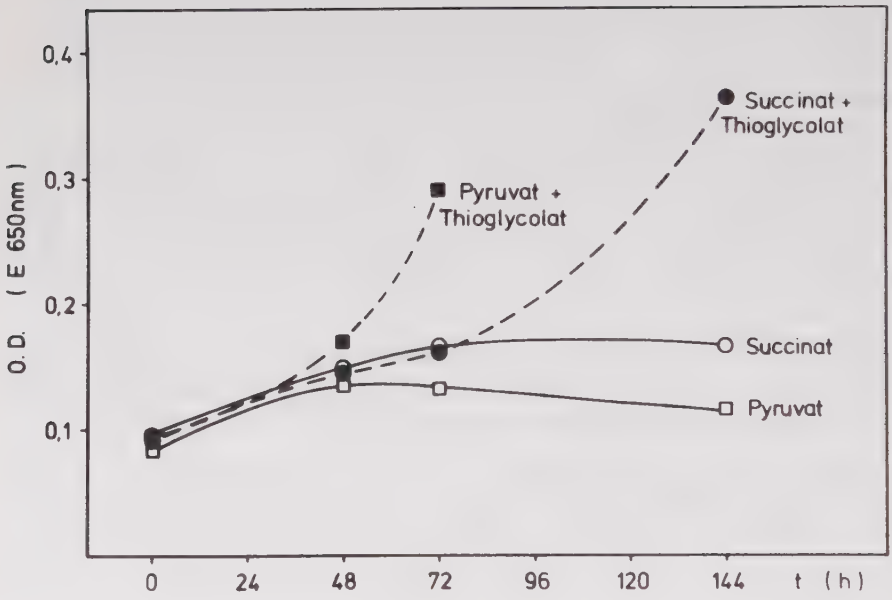


Abb.IV 11: Mikroaerobes Wachstum im Dunkeln von R.molischianum St.N 131 mit Thioglycolat als Reduktionsmittel.

Das Wachstum erfolgte in 300 ml Erlenmeyerkolben mit 100 ml Nährlösung Typ pH 6,6. Na-Thioglycolat wurde sterilfiltriert und nach dem Autoklavieren der Nährlösung zugesetzt, Endkonzentration = 0,02 %. Beimpfung mit 5 ml einer anaerob im Licht gewachsenen Vorkultur mit $O.D._{650}$ = E 1,3. Die einzelnen Meßpunkte sind Mittelwerte aus drei parallelen Ansätzen.

Damit sollte ein Vergleich zwischen den Arten der braunen Rhodospirillen untereinander, wie auch zwischen diesen und den fakultativ aeroben Rhodospirillaceae ermöglicht werden.

a) Rhodospirillum molischianum

α) Anzucht zwischen 500 und 20.000 Lux:

In Abb.IV 12 ist das photoorganotrophe Wachstum von R.molischianum bei langsam ansteigendem spezifischen Bchl.-Gehalt dargestellt. In der ersten Beleuchtungsstufe mit 540 Lux erhöhte sich der spez. Bchl.-Gehalt (Bchl./Prot.) von 21 µg/mg auf 40 µg/mg. Das Wachstum verlangsamte sich von 5,5 h am Anfang auf 8,3 h Verdopplungszeit am Ende der Periode. Dies zeigt, daß die Beleuchtung dann schon nicht mehr ausgereicht hat, um den durch die zunehmende Zelldichte geringer werdenden Lichtgenuß zu kompensieren. Nach Umschaltung auf den zweiten Bereich mit 4000 Lux verringerte sich die Verdopplungszeit auf 6,4 h und näherte sich wieder dem Ausgangswert von 5,5 h.

Am Anfang der 4000 Lux-Phase nahm der spez. Bchl-Gehalt ab, stieg dann aber etwa in der Mitte der Phase wieder an: Die Zellen passen sich zunächst an die höhere Beleuchtungsstärke an, erreichen einen Gleichgewichtspunkt (Bchl./Prot.= 32 µg/mg) und bilden sofort wieder zusätzliches Bacteriochlorophyll, um sich dem durch die zunehmende Zelldichte geringer werdenden Lichtgenuß anzupassen. Die nachfolgenden Erhöhungen der Beleuchtungsstärke bis auf 22.000 Lux konnten den durch die Zunahme der Zelldichte verringerten Lichtgenuß nicht kompensieren, d.h. der spez. Bchl.-Gehalt nahm weiter zu (von 32 bis 51 µg/mg).

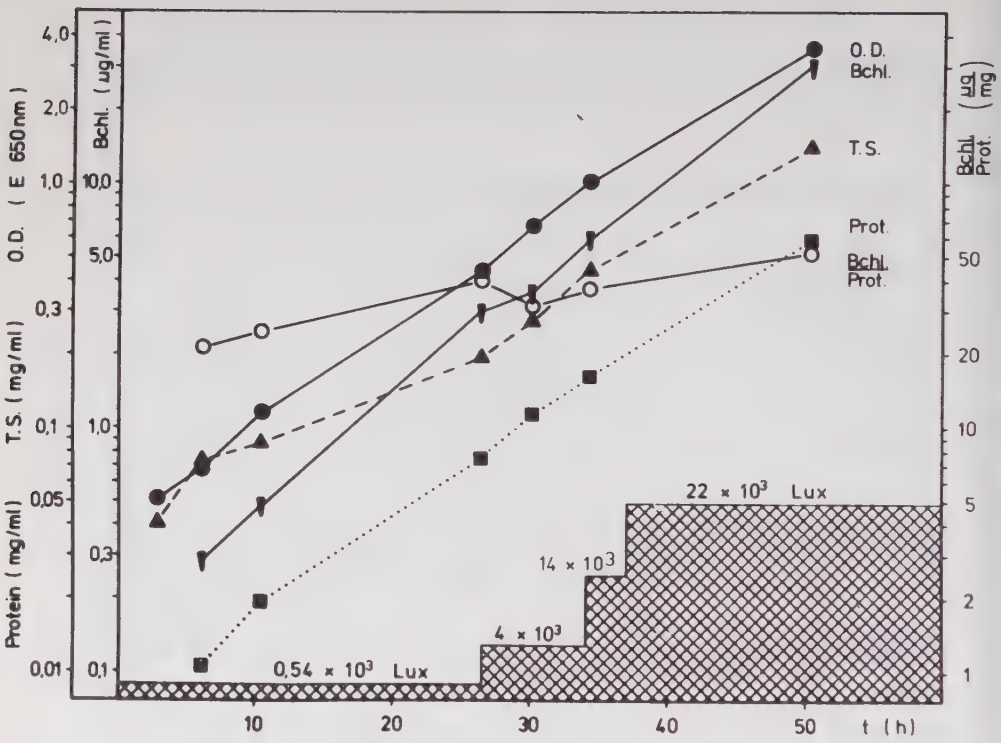


Abb.IV 12: Wachstum von R.molischianum St.N 131, anaerob im Licht mit konstantem spezifischen Bacteriochlorophyllgehalt (Bchl./Prot.) bis zu einer O.D. von E 3,7.

Die Beleuchtungsstärke (Lux) wurde entsprechend der Trübungszunahme (O.D.) erhöht. Das Wachstum erfolgte im Fermenter unter Standardbedingungen, abweichend davon enthielt die Nährlösung 2,2 g Na-Succinat und 2,2 g NH_4Cl pro l. Kürzeste Verdopplungszeit 6,4 h.

▨ = Beleuchtungsstärke

β) Anzucht zwischen 22.000 und 85.000 Lux

In dem in Abb.IV 13 dargestellten Wachstumsversuch mit R.molischianum wurde durch eine hohe Anfangsbeleuchtungsstärke, die im Laufe des Wachstums weiter erhöht wurde, der spezifische Bacteriochlorophyllgehalt bei etwa 10 µg/mg konstant gehalten. Die Beleuchtungsstärke wurde einmal von 22.000 auf

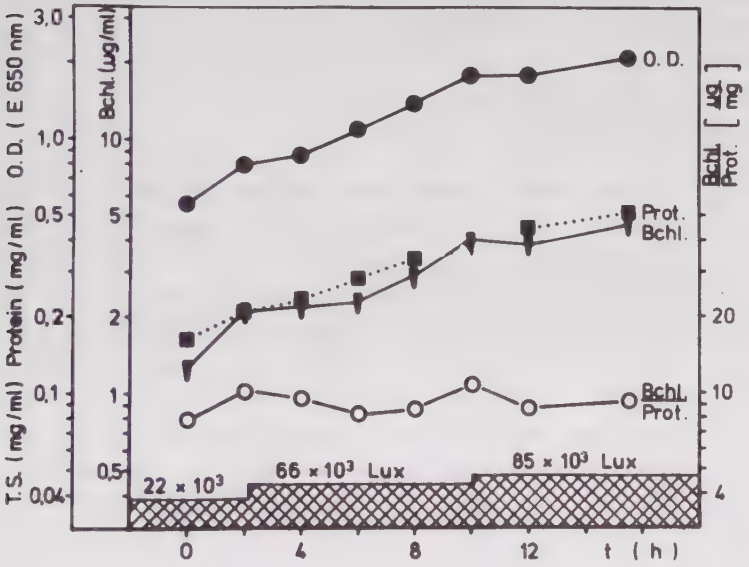


Abb.IV 13: Einfluß einer hohen Beleuchtungsstärke auf Wachstum und spez. Bchl.-Gehalt (Bchl./Prot.) bei R.molischianum St.N 131.

Das Wachstum erfolgte im Fermenter unter Standardbedingungen anaerob im Licht, abweichend davon enthielt die Nährlösung 2 g Na-Succinat pro l. Spez. Bchl.-Gehalt zu Beginn 7,8 µg/mg, kürzeste Verdopplungszeit der O.D. 3,9 h und des Bchl. 2,7 h.

▨ = Beleuchtungsstärke.

66.000 Lux und einmal von 66.000 auf 85.000 Lux erhöht. Beide Umschaltungen wirkten sich auf die Bchl.-Synthese und auch auf das Wachstum aus: Die Neubildung von Bchl. wurde vollständig reprimiert, und auch die Wachstumsgeschwindigkeit verringerte sich wesentlich. Vermutlich wurde die photosynthetische Energiegewinnung durch hohe Lichtintensität bei geringem Schutz durch die Photosynthesepigmente geschädigt. Der gleiche Effekt, der auch als Photooxidation beschrieben wurde, konnte bei Rp. acidophila St.7050 festgestellt werden: Nach Erhöhung der Beleuchtungsstärke kam das Wachstum fast zum Stillstand und setzte erst nach 2 h wieder ein.

b) Rhodospirillum fulvum

Ein repräsentativer Wachstumsversuch unter anaeroben Bedingungen im Licht mit R.fulvum ist in Abb.IV 14 dargestellt. Die hohe O.D., die hier von Anfang an vorhanden war, verursachte eine so starke Selbstbeschattung der Zellen, daß jene nicht vollständig durch die stufenweise Erhöhung der Beleuchtungsstärke auf 74.000 Lux kompensiert werden konnte; als Folge erhöhte sich der spez. Bchl.-Gehalt im gesamten Wachstumsverlauf (von 16 auf 80 g/mg) (Vergl. dagegen Abb.IV 13). Die minimale Verdopplungszeit für O.D. und Bchl. in diesem Versuch (t_d O.D. 5,2 h; t_d Bchl. 3,7 h) entspricht etwa der von R. molischianum (t_d O.D. 5,5; t_d Bchl. 5,7; Abb.IV 12).

Die drei beschriebenen Wachstumsversuche mit braunen Rhodospirillen zeigen, daß anaerob im Licht der spezifische Bchl.-Gehalt durch die Beleuchtungsstärke in gleicher Weise wie bei der fakultativ aeroben Art Rp. acidophila reguliert wird. Auf Unterschiede in der mengenmäßigen Regulierung wird in Abschnitt D eingegangen.

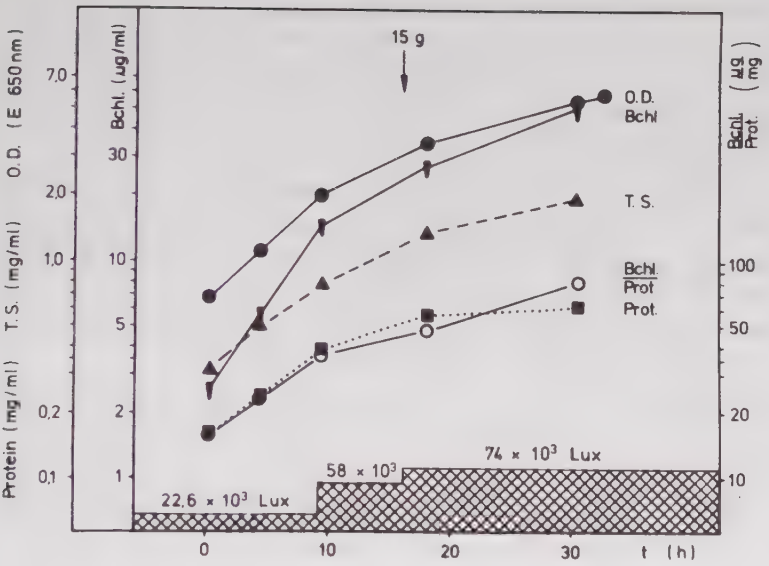


Abb.IV 14: Wachstum von R.fulvum St.10060 anaerob im Licht.

Das Wachstum erfolgte im Fermenter unter Standardbedingungen; an der mit einem Pfeil bezeichneten Stelle wurden 15 g Na-Succinat zugegeben.
Maximale O.D. = 5,84. Zu Beginn spez. Bchl.-Gehalt 15,8 µg/mg, kürzeste Verdopplungszeit der O.D. 5,2 h und des Bchl. 3,7 h.

▨ = Beleuchtungsstärke

C 2. Wachstum aerob im Licht

COHEN-BAZIRE et al. (1957) fanden bei Rp.sphaeroides aerob im Licht eine Zunahme der Wachstumsgeschwindigkeit gegenüber dem Wachstum anaerob im Licht, bei R.rubrum war sie unter beiden Bedingungen gleich; die Bchl.-Synthese wurde aerob im Licht bei beiden Arten völlig gehemmt. Mit Vertretern der braunen Rhodospirillen wurden solche Versuche noch nicht durchgeführt.

In Vorversuchen aerob im Dunkeln bei atmosphärischem pO_2 (159 Torr) konnte mit R.molischianum, R.fulvum und R.photometricum kein Wachstum gefunden werden: Erlenmeyerkolben mit 1000 ml Volumen und 100 ml Kulturlösung wurden mit 10 % Inokulum beimpft und 6 Tage im Dunkeln bebrütet. Tägliche Messungen ergaben keine Erhöhung der O.D. während dieses Zeitraumes.

Es wäre zu erwarten, daß sich diese Unterschiede auch beim Wachstum aerob im Licht manifestieren. Ein Wachstum bei hohem pO_2 im Licht würde bedeuten, daß das photosynthetische Elektronentransportsystem nicht durch Sauerstoff beeinflußt wird, so daß eine Hemmung dieses Systems durch Sauerstoff nicht die Ursache für das Unvermögen zu aerobem Wachstum im Dunkeln sein sollte.

a) R.fulvum

Das Wachstum bei atmosphärischem pO_2 im Licht wurde nur in einem Versuch mit R.fulvum untersucht, da diese Art nach den Vorversuchen die beste Sauerstofftoleranz erwarten ließ.

Der Verlauf des Wachstums und der Bchl.-Synthese ist in Abb. IV 15 dargestellt. Die Zellen wurden zunächst bei einer relativ geringen Beleuchtungsstärke vorkultiviert, um einen möglichst hohen Bchl.-Gehalt zu erhalten. Die Umschaltung wurde bei einer O.D. von E 0,99 und einem spez. Bchl.-Gehalt von 38 µg/mg vorgenommen. Während des Wachstums verringerte sich der spez. Bchl.-Gehalt auf 8,8 µg/mg. Der Bchl.-Gehalt in der Kultur blieb nur in den ersten 3 h nach Umschaltung konstant und nahm im weiteren Verlauf ständig ab. Dies bedeutet, daß

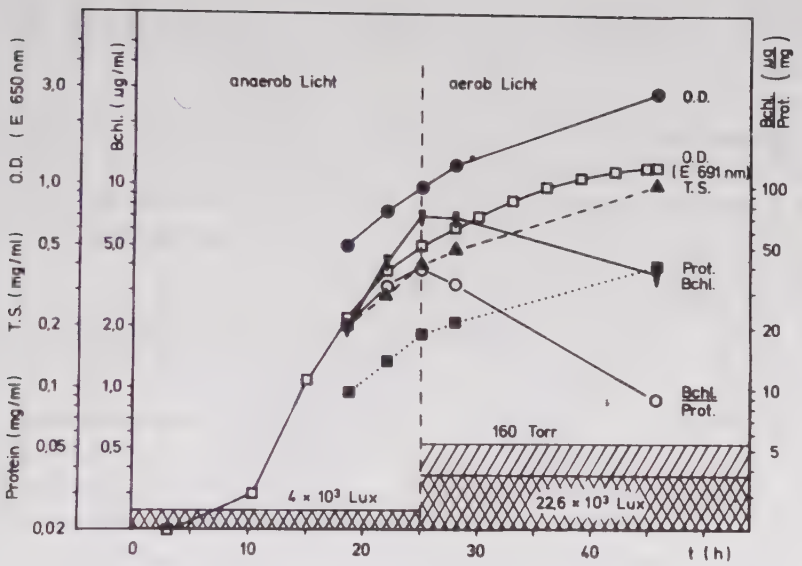


Abb. IV 15: Wachstum von R. fulvum anaerob im Licht und aerob im Licht bei atmosphärischem Sauerstoffpartialdruck (pO_2)

Das Wachstum erfolgte im Fermenter unter Standardbedingungen. Bei t = 50 h waren 48 % des Substrates Na-Succinat verbraucht. Kürzeste Verdopplungszeit anaerob-Licht 2,6 h (bei t 25 h = 7,5 h) und aerob-Licht 9,6 h (bei t 25-30 h).

= Beleuchtungsstärke = pO_2

= kontinuierliche Trübungsmessung

Bchl. in Gegenwart von Sauerstoff nicht nur mit dem Wachstum ausverdünnt, sondern regelrecht abgebaut wird.

Der Verlauf des Wachstums läßt sich klar an der Kurve der kontinuierlichen Trübungsmessung ablesen (E 691 nm in Abb.IV 15). Es zeigt sich, daß das Wachstum sich sowohl anaerob im Licht wie aerob im Licht stetig verlangsamt. Während dies aber in der ersten Phase auf Lichtbegrenzung durch abnehmenden Lichtgenuß in der dichter werdenden Kultur zurückgeht, ist in der zweiten Phase vorwiegend Lichtbegrenzung durch abnehmenden Bchl.-Gehalt die Ursache. Im Bereich der Umschaltung ist eine nennenswerte Änderung der Wachstumsrate nicht erkennbar.

Diese Befunde zeigen, daß R.fulvum genau so wie R.rubrum (COHEN-BAZIRE et al. 1957) im Licht, wenn die Kultur aerob wird, mit gleicher Rate weiterwächst. Während R.rubrum in dem Maße, wie das Pigment ausverdünnt wird, zur oxydativen Energiegewinnung übergeht, ist R.fulvum dazu nicht in der Lage, so daß das Wachstum sich stetig verlangsamt und bei einem bestimmten Pigmentgehalt zum Stillstand kommt. Ein weiterer Unterschied zu den bisher daraufhin untersuchten fakultativ aeroben Arten ist, daß R.fulvum Bacteriochlorophyll aerob im Licht abbauen kann.

C 3. Wachstum im Wechsel von mikroaerob-Licht zu mikroaerob-Dunkel.

a) R.photometricum

Die Ergebnisse des vorigen Versuches lassen die Schlußfolgerung zu, daß bei R.fulvum das phototrophe Wachstum in Gegenwart von Sauerstoff nur ungenügend durch chemotrophes Wachstum ersetzt werden kann. Die jetzt folgenden Experimente sollen diese Schlußfolgerung bei R.photometricum und R.molischianum überprüfen. Weiter sollte festgestellt werden, wie sich die Sauerstoffempfindlichkeit beim Übergang von aerob im Licht auf aerob im Dunkeln verändert.

In den Vorversuchen mit Standkolben wurde gefunden, daß braune Rhodospirillen aerob im Dunkeln unter reduzierenden Bedingungen im Kulturmedium wachsen können (Abb.IV 11). In dem in Abb.IV 16 dargestellten Experiment und dem darauffolgenden soll versucht werden, diese "reduzierenden Bedingungen" durch niedrigen pO_2 zu ersetzen.

Die wechselnden Wachstumsbedingungen in beiden Versuchen sollen die Vermutung von PFENNIG (1970) prüfen, daß die oxidative Energiegewinnung im Dunkeln bei braunen Rhodospirillen mit einem Teil des anaerob im Licht benutzten Elektronentransportsystems vor sich geht, d.h. daß das Unvermögen zu aerobem Wachstum im Dunkeln bei hohem pO_2 auf eine Hemmung der Synthese dieses Systems durch Sauerstoff zurückzuführen wäre.

Trifft die Annahme von PFENNIG zu, so sollte bei Umschaltung von anaerob-Licht auf aerob-Dunkel zunächst ein Wachstum mit dem vorhandenen Elektronentransportsystem möglich sein, welches dann durch Ausverdünnung des Systems zum Stillstand kommt. Nach erneuter Umschaltung auf anaerob-Licht sollte das Wachstum zunächst nur langsam, dann aber parallel zur Synthese des Elektronentransportsystems mit stetig zunehmender Geschwindigkeit einsetzen.

In dem im folgenden behandelten Versuch sollte durch ein alternierendes Licht-Sauerstoff-Programm auch festgestellt werden, ob die vorangegangene Phase einen Einfluß auf das Wachstum und die Pigmentsynthese hat. Der Versuch umfaßte eine Wachstumszeit von insgesamt 351 h, daraus ist ein Abschnitt von 190 h in Abb.IV 16 dargestellt; die wachstumskinetischen Berechnungen in Tab.IV 3 beziehen sich auf die gesamte Wachstumszeit. Die kontinuierliche Trübungsmessung erlaubte ,feinste Änderungen in der Wachstumsgeschwindigkeit zu registrieren, welche in Abb.IV 16 z.T. nicht darstellbar waren, jedoch in Tab.IV 3 abgelesen werden können. Der Abschnitt h (anaerob-Licht) ist uneinheitlich, da die Umschaltung auf mikroaerobe Bedingungen (pO_2 4,1 Torr) schon 2 h vor Beginn der nachfolgenden Dunkelphase (i) erfolgte.

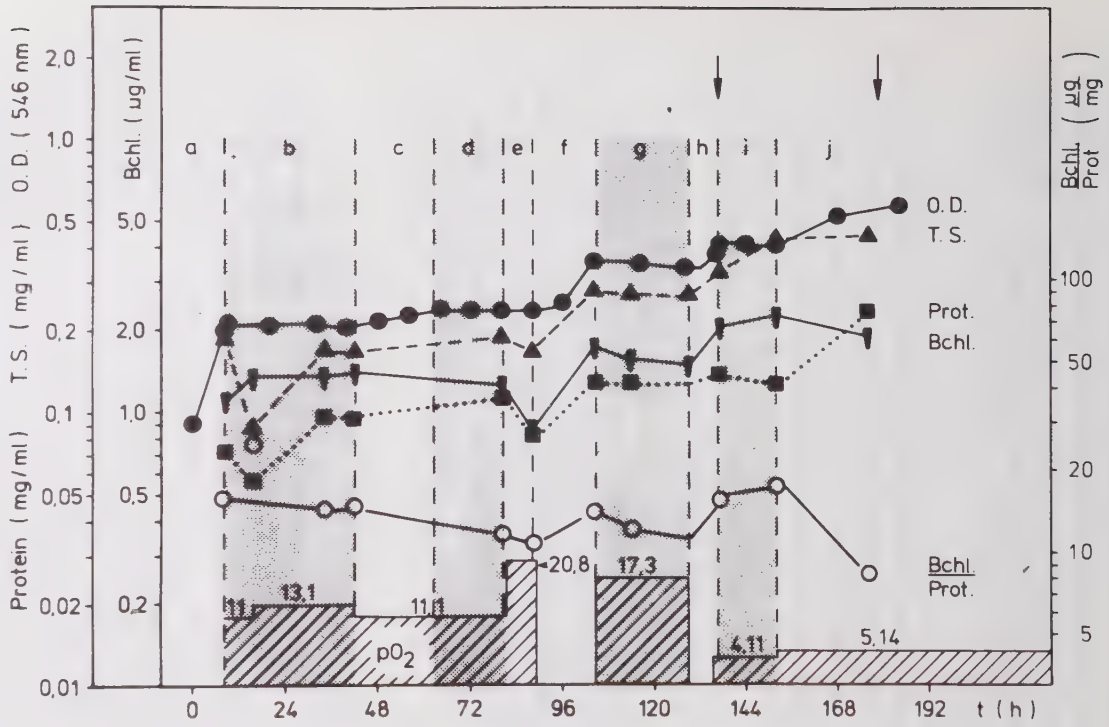


Abb.IV 16: Einfluß von Sauerstoffpartialdruck (pO_2) und Licht auf das mikroaerobe Wachstum von R. photometricum St.132.

▒ = mikroaerob-Dunkel

Das Wachstum erfolgte unter Standardbedingungen im Fermenter. In Wachstumsabschnitt a wurde mit 6000 Lux und in c, e, f, h und j mit 22.000 Lux beleuchtet. In den Abschnitten a, f und h wurden anaerobe Bedingungen durch Begasung mit Stickstoff "spezial" hergestellt. An den mit Pfeilen bezeichneten Stellen wurden jeweils 10 g Na-Succinat zugegeben.

α) Regulation des Bchl.-Gehaltes.

Bacteriochlorophyll mikroaerob im Licht (Abschnitte c, e und j).
Auch im Licht läßt sich eine klare Abhängigkeit vom Sauerstoffgehalt erkennen. Ein hoher pO_2 hatte wie bei R.fulvum einen Abbau des Bchl. zur Folge. Bei niedrigem pO_2 blieb der Bchl.-Gehalt, solange die Bchl.-Synthese reprimiert war, konstant. Mit einem pO_2 von 21 Torr (Abschnitt e) verringerte sich der Bchl.-Gehalt in 7,5 h von 1,3 µg/ml auf 0,9 µg/ml. Bei pO_2 5,1 Torr (Abschnitt j) nahm der Bchl.-Behalt zuerst geringfügig ab, um dann während 120 h konstant zu bleiben (nicht dargestellt).

Die starke Abnahme des s p e z i f i s c h e n Bchl.-Gehaltes in Abschnitt j ist durch den relativ schnellen Anstieg des Proteins bedingt und vielleicht nicht ganz repräsentativ. Bemerkenswert ist jedenfalls, daß bei R.photometricum auch bei einem pO_2 von 5 Torr im Licht noch keine Bchl.-Synthese stattfindet.

Bacteriochlorophyll mikroaerob im Dunkeln (Abschnitte b, d, g und i).
Auch im Dunkeln konnte zwischen 5 und 20 Torr noch keine Bchl.-Synthese beobachtet werden, bei pO_2 4,1 Torr (Abschnitt i) ist dagegen eine leichte Zunahme erkennbar. Während unterhalb von etwa 13 Torr der Bchl.-Gehalt im Dunkeln konstant blieb, nahm er darüber sogar leicht ab. Auch beim Proteingehalt der Kultur war nach Umschaltung (Abschnitt g) eine gewisse Abnahme festzustellen. Da jedoch der Bchl.-Gehalt deutlich stärker zurückging, muß auf einen intrazellulären Abbau geschlossen werden, wie er schon bei R.fulvum (Kap. C 2) gefunden wurde.

β) Kinetik des Wachstums

Der Wachstumsverlauf des Versuches zeigt drei wichtige Befunde: 1. Mikroaerob im Dunkeln war bei keinem der gewählten Sauerstoffpartialdrücke ein Wachstum möglich. 2. Mikroaerob im Licht im Bereich zwischen 4 bis 11 Torr nimmt die Zelldichte langsam

zu. 3. Nach einer aeroben Vorphase setzt das Wachstum anaerob im Licht mit zeitlicher Verzögerung ein. Im Einzelnen ergab sich folgendes:

Wachstum anaerob im Licht (Abb.IV16 und Tab.IV 3, Abschnitte a, f und h). Zu Beginn des Versuches (Abschnitt a), der mit einer phototroph gewachsenen Kultur beimpft wurde, war die Wachstumsgeschwindigkeit am höchsten (t_d 5,4), sie entsprach der von R. molischianum (t_d 5,8) und R.fulvum (t_d 5,2 h) unter entsprechenden Beleuchtungsverhältnissen.

In Abschnitt f mit Vorkulturbedingungen mikroaerob im Licht bei relativ hohem pO_2 (20,8 Torr) setzte das Wachstum erst 3 h nach Umschaltung ein, dann aber mit stetig zunehmender Geschwindigkeit. In Abschnitt h mit Vorkulturbedingungen mikroaerob im Dunkeln (pO_2 17,3 Torr) begann das Wachstum nur mit geringer Verzögerung und erhöhte sich dann noch schneller als in Abschnitt f.

Da in den aeroben Vorphasen kein Wachstum stattgefunden hat, kann die nachfolgende Wachstumsverzögerung unter phototrophen Bedingungen nicht auf Ausverdünnung von Komponenten des Elektronentransportsystems (ETS) beruhen. Offensichtlich werden unter aeroben Bedingungen ETS-Komponenten abgebaut und müssen beim Eintreten phototropher Bedingungen erneut synthetisiert werden. Die Wachstumsgeschwindigkeit nimmt dann proportional zur Synthese der Elektronentransport-Komponenten bis zur Auffüllung des Systems zu.

Wachstum mikroaerob im Licht (Abb.IV 16 und Tab.IV 3, Abschnitte c, e, h und j). Die Phase mit dem höchsten pO_2 (Abschnitt e, pO_2 20 Torr) zeigte kein Wachstum, nach Absenkung des pO_2 auf 11 Torr (Abschnitt c) nahm die Zelldichte nur in den ersten 6 h zu. Erst bei pO_2 5,1 Torr (Abschnitt j) erfolgte ein Wachstum über einen längeren Zeitraum mit anfänglich abnehmender, aber dann gleichbleibender Verdopplungszeit von 48 h.

Tab.IV 3: Verdopplungszeit (t_d) von E.photometricum St.N 132 bei Wachstum anaerob im Licht (an-L), mikroaerob im Licht (mae-L) und mikroaerob im Dunkeln (mae-D).

(1) Wachstumsabschnitt (Abb.IV 16)	(2) Wachstumszeit seit Versuchsanfang (Abb.IV 16)(h)	(3) Wachstumsbedingungen pO_2(Torr)	(4) Zeit nach Einstellg.der Wachstumsbedingungen (h)	(5) t_d (h)
a	0	an-L 0	1	5,4
			25	6,7
f	89	an-L 0	2,5	-
			4,5	33,3
			9,5	19,4
			13,5	13,4
h	128	an-L 0	2,3	27,7
			5,2	18,2
e	80	mae-L 20	0 - 9	-
c	41	mae-L 11	2,0	-
			4,0	58,2
			6,0	120,0
			18,0	-
j	152	mae-L 5,1	2	28,9
			5,5	49,6
			58,0	47,0
h	136	mae-L 4,1	1,0	13,8
g	103	mae-D 17,3	0 - 4	-
			4 -25	161,6
b	9	mae-D 13,1	0 -32	-
d	61	mae-D 11,0	0 -16	-
i	140	mae-D 4,1	0 -14	-

Die Meßwerte stammen aus dem Wachstumsversuch in Abb.IV 16. Die Verdopplungszeit wurde aus der Zu- oder Abnahme der O.D. = E 691 nm (kontinuierliche Trübungsmessung) berechnet.

Spalte 5: (-) bedeutet kein Wachstum ($t_d \infty$)

Interessant war, daß sich die Verdopplungszeit erniedrigte, als nach anaerober Lichtkultur (Abschnitt h) ein pO_2 von 4,1 Torr eingestellt wurde. Diese Beobachtung legt die Annahme sehr nahe, daß sich zur photosynthetischen eine oxidative Energiegewinnung addiert hat (Vergl. auch COHEN-BAZIRE et al. 1957, Seite 48 u. 50).

Die Phasen mikroaerob im Licht ließen eine Verringerung der Wachstumsgeschwindigkeit mit steigendem pO_2 erkennen, worin eine Hemmung der photosynthetischen Energiegewinnung durch Sauerstoff gesehen werden kann.

Die anfänglich höhere Wachstumsgeschwindigkeit in den Abschnitten c und j ist vermutlich auf die Wirkung von anaerob im Licht gebildeten ETS-Komponenten zurückzuführen, die offensichtlich in den vorangegangenen mikroaeroben Dunkelphasen nicht abgebaut wurden.

Wachstum mikroaerob im Dunkeln (Abb.IV 16 und Tab.IV 3, Abschnitte b, d, g und i). Ein deutlich erkennbares Wachstum war in keinem der vier Abschnitte festzustellen. In Abschnitt g bei pO_2 17 Torr nimmt die Trübung langsam ab. Dies könnte darauf zurückgehen, daß Zellsubstanz veratmet wird, ohne daß dabei nennenswert Energie gewonnen wird (kein Wachstum!). Der Elektronentransport wäre also von der Energiegewinnung entkoppelt.

γ) Schlußfolgerungen

R.photometricum konnte aerob im Licht in einem pO_2-Bereich wachsen, in dem aerob im Dunkeln kein Wachstum möglich war.

Die Wachstumsgeschwindigkeit war mikroaerob im Licht höher als anaerob im Licht. Dies kann in der additiven Energiegewinnung (COHEN-BAZIRE et al. 1957) eine Erklärung finden: werden beide Arten der Energiegewinnung (oxidative und photosynthetische) gleichermaßen durch den Sauerstoff gehemmt, so steht mikroaerob im Licht mehr Energie zur Verfügung als mikroaerob im Dunkeln. Deshalb kann das Wachstum mikroaerob im Licht bei einem höheren pO_2 ablaufen als mikroaerob im Dunkeln.

Die schwache Bchl.-Synthese mikroaerob im Dunkeln bei pO_2 4,1 Torr zeigt, daß unterhalb dieses pO_2 eine oxidative Energiegewinnung stattfinden kann. Der dabei gewonnene geringe Energiebetrag wird von der Zelle nur zur Bchl.-Synthese eingesetzt. Ein ähnliches Verhalten zeigten braune Rhodospirillen unter anaeroben Bedingungen bei sehr geringer Beleuchtungsstärke, wo nur eine schwache Bchl.-Synthese ohne Zellvermehrung auftrat. Nach einer Erhöhung der Beleuchtungsstärke setzte dann das Wachstum ein. Analog dazu kann man bei R.photometricum annehmen, daß die oxidative Energiegewinnung bei weiterer Absenkung des pO_2 noch zunimmt und dadurch eine Zellvermehrung zustande kommt.

b) R.molischianum

In den beiden letzten Fermenterversuchen erwies sich R.fulvum als relativ unempfindlich gegen Sauerstoff, während R.photometricum offensichtlich nur bei überaus geringem pO_2 wachsen kann. Nach den Ergebnissen des Standkolbenversuchs mit Thioglycolat (Abb.IV 11) sollte man annehmen, daß R. m o l i s c h i a n u m in seinem Verhalten gegenüber Sauerstoff auch im Fermenter zwischen den beiden anderen braunen Rhodospirillen-Arten liegt. Der im folgenden beschriebene Versuch bestätigte dies.

Der Versuch (Abb.IV 17 und Tab.IV 4) umfaßte die Wachstumsbedingungen anaerob-Licht, mikroaerob-Dunkel bei pO_2 9 und 15 Torr und mikroaerob-Licht ebenfalls bei pO_2 9 und 15 Torr.

α) Kinetik des Wachstums.

Ein Wachstum fand (im Gegensatz zum vorhergehenden Versuch mit R.photometricum) in allen fünf Abschnitten (a bis e) statt: Mikroaerob im Dunkeln bei pO_2 15 Torr (Abschnitt b) war schon nach 20 h keine Zunahme der Zelldichte festzustellen, danach nahmen Trübung und Trockensubstanz ab. Das sofort nach Einschaltung der Beleuchtung wieder einsetzende Wachstum (Ab-

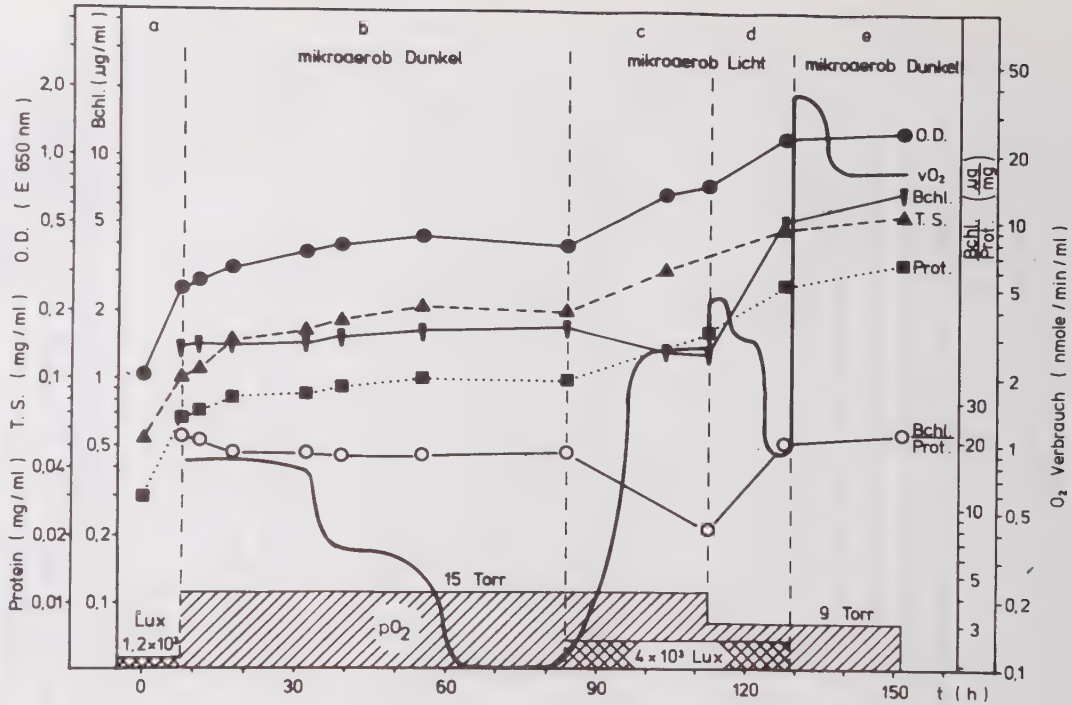


Abb.IV 17: Wachstum, Bchl.-Synthese und Sauerstoffverbrauchsrate (vO_2) von R.molischianum St.N 131, bei Sauerstoffpartialdrücken von 15 und 9 Torr, mikroaerob im Dunkeln und mikroaerob im Licht.

Das Wachstum erfolgte im Fermenter unter Standardbedingungen. Begasung intermittierend mit der ersten Ausbaustufe der Sauerstoff-Meß-und Regelanlage (Kap.III C). Die Sauerstoffverbrauchsrate (vO_2) wurde mit Gleichung 1 und 3 (Kap.II D8) berechnet. Weitere Wachstumsparameter siehe Tab. IV 4.

▨ = Beleuchtungsstärke

schnitt c) zeigt, daß das phototrophe Elektronentransportsystem durch den Abbau von Zellsubstanz nicht nennenswert geschädigt wurde. Im weiteren Verlauf der Lichtphase bei pO_2 15 Torr nahm die Wachstumsgeschwindigkeit stetig ab (Tab.IV 4, Spalte 5). Aus der gleichzeitigen Verringerung des Bchl.-Gehaltes der Zellen läßt sich mit einiger Sicherheit schließen, daß durch verminderte Lichtquantenaufnahme die Energiegewinnung begrenzt wurde.

Genau entgegengesetzt war der Wachstumsverlauf bei pO_2 9 Torr im Licht (Abschnitt d); hier setzte das Wachstum nur langsam ein und beschleunigte sich stetig. Die Erklärung liefert die bei pO_2 9 Torr sehr schnell einsetzende Bchl.-Synthese, welche damit erneut die überwiegende photosynthetische Energiegewinnung unter mikroaeroben Bedingungen im Licht bezeugt.

Nach Abdunkelung der Kultur bei unverändertem pO_2 (Abschnitt e, Tab.IV 4) kam das Wachstum fast zum Stillstand, setzte dann aber langsam wieder ein und erreichte am Schluß immerhin eine Verdopplungszeit von 52 h. Damit ließ sich erstmalig zeigen, daß R.molischianum bei definiertem pO_2 im Dunkeln kultiviert werden kann.

Bemerkenswert in Abschnitt e ist auch der Wachstumsstillstand nach Umschaltung von mikroaerob-Licht auf mikroaerob-Dunkel; er zeigt nämlich, daß eine nennenswerte oxidative Energiegewinnung im Dunkeln nicht mit dem mikroaerob im Licht verwendeten photosynthetischen ETS durchführbar ist. Die stetige Zunahme der Wachstumsgeschwindigkeit mikroaerob im Dunkeln erscheint nur durch die Neubildung eines oxidativen ETS-Systems oder von ETS-Komponenten möglich.

Tab.IV 4: Verdopplungszeit (t_d) und spezifische Sauerstoffverbrauchsrate (spez.vO_2) bei R.molischianum St.N 131 bei Wachstum anaerob im Licht (an-L), mikroaerob im Licht (mae-L) und mikroaerob im Dunkeln (mae-D).

(1) Wachstumsabschnitt (s.Abb.IV 17)	(2) Wachstumsbedingungen	pO_2 (Torr)	(3) Zeit nach Einstellg. von (2) (h)	(4) spez.vO_2 ($nmole\ min^{-1}\ mgProt^{-1}$)	(5) t_d (h)
a	an-L	0	8,4	0,0	2,8
			12,1	0,0	4,3
b	mae-D	15	4,9	-	72,1
			17,3	9,7	23,5
			34,0	3,4	129,3
			50,0	2,2	-
			65,0	0,9	- 91,8
e	mae-D	9	4,0	135,3	313,3
			12,0	56,1	108,1
			18,5	19,0	105,9
			23,3	50,7	51,7
c	mae-L	15	3,0	1,4	14,0
			8,6	3,4	27,8
			12,6	8,3	32,1
			21,3	17,9	42,2
d	mae-L	9	1,9	25,9	57,6
			5,4	15,1	31,8
			8,9	12,8	16,3
			13,0	3,5	11,6

Die Meßwerte stammen aus dem Wachstumsversuch Abb.IV 17. Die Verdopplungszeit wurde aus der Zu- oder Abnahme der O.D. = E 691 nm(kontinuierliche Trübungsmessung) berechnet . Zur Ermittlung der spezifischen vO_2 wurden die aus Kjeldahl-Stickstoff berechneten Proteinwerte verwendet.

β) Bchl.-Synthese

Das Wachstum mikroaerob im Dunkeln bei pO_2 9 Torr war von einer Bchl.-Synthese begleitet, während das sehr geringe Wachstum bei pO_2 15 Torr mit einem abnehmenden Bchl.-Gehalt der Zellen verbunden war.

Trotz annähernd gleichem spezifischen Bacteriochlorophyllgehalt der mikroaeroben Dunkelphasen war ein Wachstum nur bei pO_2 9 Torr möglich, so daß auch bei R.molischianum ein Zusammenhang zwischen spez. Bchl.-Gehalt und Wachstum mikroaerob im Dunkeln nicht wahrscheinlich ist.

Bemerkenswert im mikroaeroben Wachstumsabschnitt im Licht ist, daß das Pigment bei einem pO_2, der keine Synthese gestattet (pO_2 15 Torr, Abschnitt c), intrazellulär abgebaut wird.

γ) Sauerstoffverbrauchsrate

Messungen der Sauerstoffverbrauchsrate unter Wachstumsbedingungen über einen längeren Zeitraum sind an phototrophen Bakterien hier zum erstenmal durchgeführt worden. Die bei R.molischianum gemessenen Sauerstoffverbrauchsraten von 0,1 bis 37 nmol$en O_2 \cdot min^{-1} \cdot ml^{-1}$* (Abb.IV 17 u.Tab.IV 4) sind mit den Raten von Rp.acidophila vergleichbar: Bei einer O.D. von E 0,4 - 1,0 und Succinat als Substrat wurden aerob im Dunkeln Raten von 8,5 bis 32,3 nmol$en O_2 \cdot min^{-1} \cdot ml^{-1}$ gemessen. Sauerstoffverbrauchsraten in der gleichen Größenordnung (0,1 bis 10,0 nmole $O_2 \cdot min^{-1} \cdot ml^{-1}$) fanden HAMILTON & HOLMES (1970) bei E.coli mit Glycerin als Substrat.

Zu Beginn der ersten mikroaerob-Dunkel-Phase (Tab.IV 4, Abschnitt b) entspricht die höhere spezifische Sauerstoffverbrauchsrate (spez. vO_2) der höheren Wachstumsgeschwindigkeit. Die Rate verringert sich mit der Verlangsamung des Wachstums

* bei R.molischianum relativ (d.h. ohne Berücksichtigung des CO_2-Gehaltes), bei Rp.acidophila und E.coli absolut gemessen (vergl.Kap.II G 8).

und geht bei Wachstumsstillstand auf weniger als 1/4 der Anfangsrate zurück.

Obwohl das Wachstum unter mikroaeroben Bedingungen im Licht (Abschnitte c und d) überwiegend photosynthetisch sein dürfte, ist doch auch hier ein gewisser Sauerstoffverbrauch festzustellen. Die Rate nahm mit wiedereinsetzendem Wachstum (Absch.C) stetig zu und zwar auch dann noch, als sich das Wachstum wieder verlangsamte. Nach Absenken des pO_2 auf 9 Torr verringerte sich die O_2-Aufnahme bei steigender Wachstumsgeschwindigkeit, was auf zunehmendes Übergewicht photosynthetischer Energiegewinnung schließen läßt.

Die Änderung der Wachstumsbedingungen durch Abschalten der Beleuchtung (Abschnitte d und e) oder Herabsetzung des pO_2 im Licht (Absch. c - d) bewirkte kurzfristig eine Erhöhung der spez. vO_2. Die mit der Umstellung verbundene Änderung der Energiegewinnung oder der wieder einsetzende photosynthetische Elektronentransport könnten eine Entkopplung des ETS von der Energiegewinnung bewirkt haben, die dann eine erhöhte Sauerstoffverbrauchsrate zur Folge hat.

Da im Dunkeln erst im pO_2-Bereich von 9 Torr mit einer hohen spez. vO_2 ein andauerndes Wachstum möglich war, ist eine oxidative Energiegewinnung im pO_2-Bereich von 15 Torr mit einer sich ständig verringernden spezifischen Sauerstoffverbrauchsrate und auslaufendem Wachstum zumindest zweifelhaft.

δ) Schlußfolgerungen.

Die an R.molischianum gewonnenen Ergebnisse zeigen, daß ein Wachstum aerob im Dunkeln nur bei einem pO_2 möglich ist, bei welchem die Bchl.-Synthese ablaufen kann. Im Licht ist ein andauerndes Wachstum ebenfalls an diesen pO_2 gebunden.

Mikroaerob im Licht macht die mit zunehmender Wachstumsgeschwindigkeit geringer werdende spez. vO_2 deutlich, daß der Beitrag der Atmung zur Energiegewinnung mit steigender Wachstumsrate abnimmt.

C 4. Wachstum mikroaerob im Dunkeln

Die Wachstumsversuche mikroaerob im Dunkeln hatten den Zweck, die Bedingungen für ein andauerndes chemoorganotrophes Wachstum festzustellen, die mit den Wachstumsversuchen aerob im Licht entwickelten Vorstellungen zu bestätigen und die Beurteilung der Arbeitshypothesen (Kap. I) zu ermöglichen.

Im folgenden sind 4 typische Wachstumsversuche beschrieben. Die festgestellten Ergebnisse sind immer durch mehrere Parallelansätze gesichert.

a) R.molischianum

Das Verhalten von R.molischianum unter mikroaeroben Bedingungen im Dunkeln soll anhand zweier Versuche besprochen werden, die bei unterschiedlichem pO_2 durchgeführt wurden; der erste bei 9 - 10 Torr (Abb.IV 18), der zweite überwiegend zwischen 4 und 7 Torr (Abb.IV 19).

α) pO_2 9 - 10 Torr (Abb.IV 18)

Dieser Versuch hatte den Zweck, das im vorigen Experiment bei pO_2 9 Torr im Dunkeln gefundene Wachstum über einen längeren Zeitraum hinweg zu verfolgen und den oberen pO_2-Grenzbereich zu ermitteln.

Durch Abstellen der Sauerstoffzufuhr im Dunkeln am Schluß des Versuches sollte festgestellt werden, ob Wachstum und Energiegewinnung unter Gärungsbedingungen möglich sind.

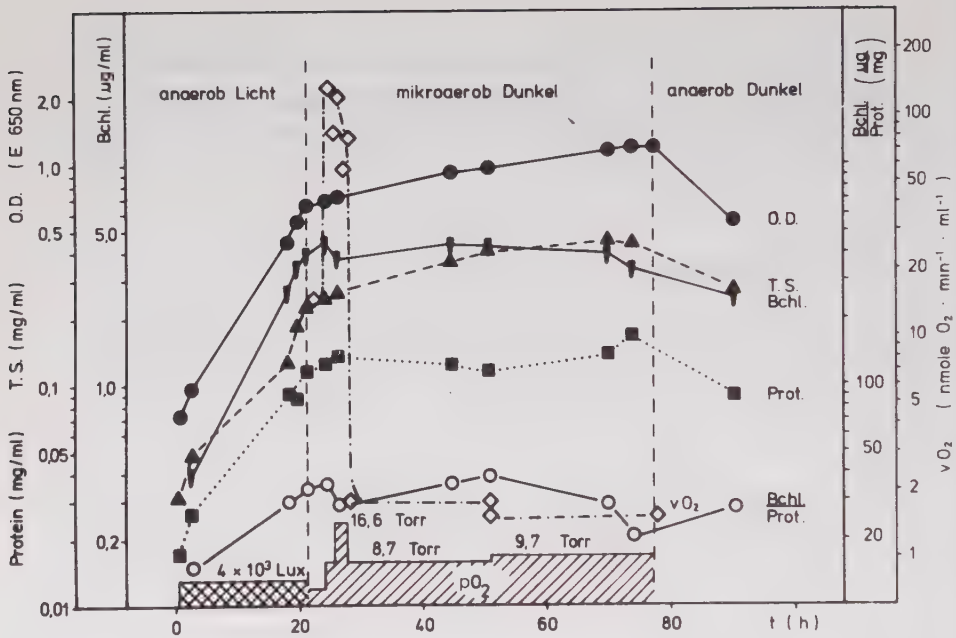


Abb.IV 18: Sauerstoffverbrauchsrate (vO_2) und Wachstum von R.molischianum St.N 131 nach Änderung des Sauerstoffpartialdruckes (pO_2) und der Beleuchtung.

Das Wachstum erfolgte im Fermenter unter Standardbedingungen, abweichend davon enthielt die Nährlösung 2 g Hefeextrakt pro l. Begasung intermittierend mit der ersten Ausbaustufe der Sauerstoff-Meß- und Regelanlage (Kap. III C). Berechnung der Sauerstoffverbrauchsrate (vO_2) mit Gleichung 1 und 3 (Kap. II D 8). Der erste pO_2-Bereich nach Umschaltung von anaerob-Licht auf mikroaerob-Dunkel hatte pO_2 = 5,4 Torr. Maximale vO_2 = 134 nmole $O_2 \cdot min^{-1} \cdot ml^{-1}$. Weitere Wachstumsparameter in Tab. IV 5.

▨ = Beleuchtungsstärke

Tab.IV 5: R.molischianum (St.N 131), Abhängigkeit der spezifischen Sauerstoffverbrauchsrate (spez. vO_2) und der Verdopplungszeit (t_d) vom Sauerstoffpartialdruck (pO_2).

(1) Wachstumsbedingungen		(2) Zeit nach Einstellg.von (1)	(3) t_d	(4) spez.vO_2
	pO_2 (Torr)	(h)	(h)	(nmole·min^{-1}·mgProt^{-1})
an-L.	-	5,5	4,4	-
	-	19,3	6,0	-
mae-D.	2,7	1,3	28,5	120,3
	16,6	4,0	71,7	753,8
	8,7	14,0	49,5	13,8
	9,7	27,3	57,0	15,2
	10,6	45,0	123,7	11,8
	10,6	51,5	-153,8	10,2
an-D.	-	2,0	- 14,7	-
	-	8,5	- 8,5	-

Die Meßwerte stammen aus dem Wachstumsversuch Abb.IV 18. Die t_d wurde aus der Zu- oder Abnahme der O.D. = E 691 nm (kontinuierliche Trübungsmessung) berechnet. Die Ermittlung der spez. vO_2 erfolgte mit den aus Kjeldahl-Stickstoff berechneten Proteinwerten.

an-L. = anaerob-Licht, mae-D = mikroaerob-Dunkel,

an-D. = anaerob-Dunkel.

Mikroaerob-Dunkel. Verfolgt man das Wachstum mikroaerob im Dunkeln anhand der Verdopplungszeiten aus der kontinuerlichen Trübungsmessung (Tab.IV 5), so ergibt die Phase mit dem geringsten pO_2-Wert (2,7 Torr) direkt nach dem Wechsel von anaerob-Licht auf mikroaerob-Dunkel die höchste Wachstumsgeschwindigkeit. Die nachfolgende Erhöhung des pO_2 auf 16,6 Torr hatte eine starke Verminderung der Wachstumsrate zur Folge, die sich aber bei erneuter Herabsetzung des pO_2 (auf 8,7 Torr) sehr bald wieder erhöhte. Eine zweite Heraufsetzung des pO_2 etwa in der Mitte des Wachstumsabschnittes mikroaerob-Dunkel (Abb.IV 18) äußerte sich wieder in einer Verlängerung der Verdopplungszeit. Eine nochmalige Erhöhung des pO_2 (auf 10,6 Torr) gegen Ende des Wachstumsabschnittes führte dann zu Wachstumsstillstand und Abnahme der O.D.

Diese fein abgestufte Reaktion des Wachstums auf den pO_2 kam auch in der Bchl.-Synthese (Abb.IV 18) zum Ausdruck: Die Synthese begann unterhalb von pO_2 8,7 Torr und erhöhte sich erheblich bei pO_2 2,7 Torr. Ein weiterer Anstieg des pO_2 über 8,7 Torr hatte einen intrazellulären Bchl.-Abbau zur Folge, der sich bei pO_2 16,6 Torr noch weiter verstärkte.

Sauerstoffverbrauchsrate. Die Kurve des Sauerstoffverbrauchs in Abb.IV 18 läßt drei charakteristische Merkmale erkennen: Ein fast gleichbleibend niedriger Sauerstoffverbrauch im pO_2-Bereich 9 - 11 Torr, ein sprunghafter Anstieg bei pO_2 16,6 Torr und eine etwas erhöhte Rate nach Umschaltung von anaerob-Licht auf mikroaerob-Dunkel in der Phase mit pO_2 2,7 Torr.

Die spez. vO_2 der bei pO_2 9 - 11 Torr wachsenden Kultur (Tab. IV 5) erreichte ähnliche Werte wie bei pO_2 15 Torr im vorigen Versuch. Auch die Verdopplungszeiten (mit t_d 50 h) sind vergleichbar, so daß eine leichte Anhebung des pO_2 in dieser Phase keine hemmende Wirkung auf Wachstumsgeschwin-

digkeit und Sauerstoffverbrauch haben würde. Dagegen war bei pO_2 16,6 Torr die Sauerstoffverbrauchsrate bereits wesentlich höher, und die Verdopplungszeit verlängerte sich. Dies läßt erneut auf eine Entkopplung des ETS von der oxidativen Energiegewinnung schließen.

Der höhere Sauerstoffverbrauch in der Phase mit dem geringsten pO_2 (2,7 Torr) fällt dagegen mit einer Zunahme der Wachstumsrate zusammen und ist so mit einer größeren oxidativen Energiegewinnung verbunden.

Anaerob-Dunkel. Ein stärkerer Abfall der Wachstumskurven zeigte sich unter Gärungsbedingungen anaerob im Dunkeln, während mikroaerob im Dunkeln bei pO_2 11 Torr nur eine geringe Abnahme der O.D. festzustellen war (Tab.IV 5). Mikroskopische Untersuchungen der Zellen während des Versuches ergaben eine Lyse der Zellen unter Gärungsbedingungen, während eine solche im Abschnitt davor nicht feststellbar war. Wachstumsversuche anaerob im Dunkeln in Flaschen brachten das gleiche Ergebnis: Nach wenigen Tagen waren bis zu 90 % der Zellen lysiert. Somit kann eine Energiegewinnung durch Gärung unter diesen Bedingungen ausgeschlossen werden.

Im Anschluß an den Abschnitt anaerob-Dunkel wurde die Kultur im Dunkeln erneut mit Sauerstoff begast (pO_2 5,4 Torr), wonach die Abnahme der Trübung langsam zum Stillstand kam. Unter den gleichen mikroaeroben Bedingungen im Dunkeln wurde in anderen Versuchen stets ein Wachstum erzielt, so daß kein Zweifel besteht, daß die anaeroben Bedingungen im Dunkeln zu einer starken Schädigung der Zellen führen, wohingegen die Abnahme des Bchl.-Gehaltes und der O.D. bei hohem pO_2 sicher nicht mit einem lytischen Abbau der Zellsubstanz einhergeht. Dieser intrazelluläre Abbau von Zellsubstanz sollte eher im Zusammenhang mit einer zum Erhaltungsstoffwechsel benötigten Energiegewinnung gesehen werden.

β) pO_2 4-7 Torr (Abb.IV 19, Tab.IV 6 u.IV 7)

In diesem Versuch wurde nach teilweiser Neubefüllung des Fermenters der vorige Wachstumsversuch mit einem niedrigeren pO_2 fortgesetzt. Im ersten Abschnitt, anaerob-Licht, wurde eine

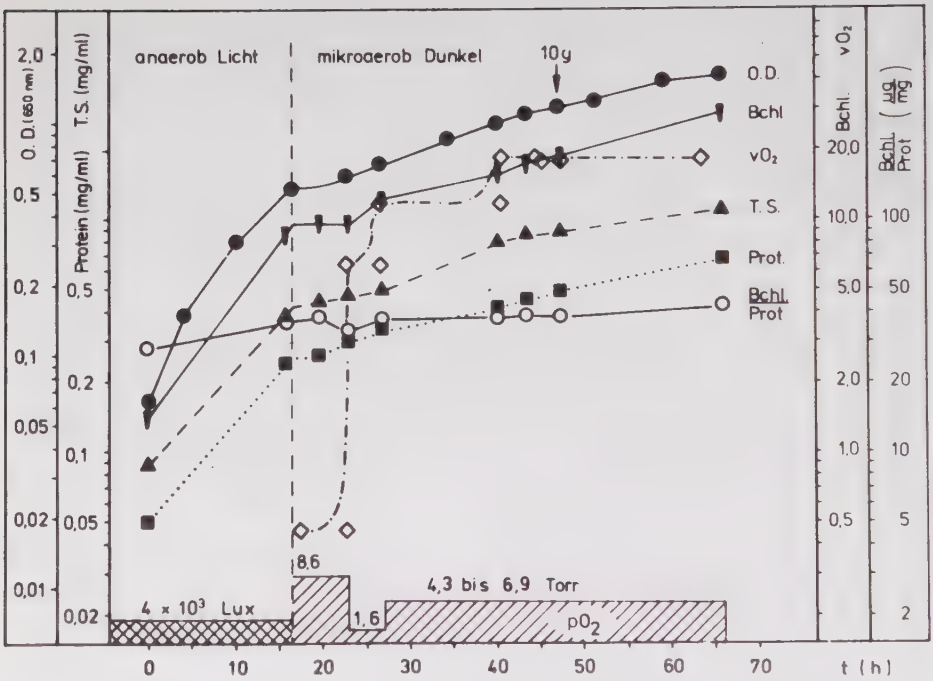


Abb.IV 19: Wachstum und Sauerstoffverbrauchsrate (vO_2) von R.molischianum St.N 131, mit konstantem spezifischen Bacteriochlorophyllgehalt (Bchl./Prot.) mikroaerob im Dunkeln.

Dieser Wachstumsversuch ist eine Weiterführung des Versuchs in Abb.IV 18. Vor Anfang dieses Versuches und nach Abschluß des Wachstumsversuches Abb.IV 18, wuchsen die Zellen 7 h im Dunkeln bei pO_2 5,1 Torr, dann wurde der Fermenter teilweise entleert und mit 4 l Nährlösung aufgefüllt. In dieser Abb. nicht angegebene Wachstumsbedingungen sind Abb.IV 18 zu entnehmen. Weitere Wachstumsparameter in Tab.IV 6 u.IV 7.

⊠⊠⊠ : Beleuchtungsstärke
·—·—· : vO_2, nmole · min^{-1} · ml^{-1}
|—| : Bacteriochlorophyll, µg · ml^{-1}

geringe Beleuchtungsstärke eingesetzt, um so einen hohen spez. Bchl.-Gehalt der Zellen zu erreichen. Damit sollte die Wirkung eines hohen Photosynthesepigmentgehaltes auf das Wachstum mikroaerob im Dunkeln geprüft werden.

Kinetik des Wachstums. Im Gegensatz zum vorigen Versuch fand in allen pO_2-Phasen ein Wachstum statt. Die Wachstumsgeschwindigkeit war abhängig vom pO_2 wie aus Tab.IV 6 zu ersehen ist; die längste Verdopplungszeit zeigte sich in der pO_2-Phase mit dem höchsten Sauerstoffpartialdruck (8,6 Torr), die geringste im mittleren pO_2-Bereich (6-7 Torr); in der Phase mit dem niedrigsten pO_2 (1,6 Torr) erhöhte sich die Verdopplungszeit wieder. Diese Ergebnisse machen deutlich, daß das pO_2-Optimum mikroaerob im Dunkeln nahe am oberen pO_2-Grenzbereich für das mikroaerobe Wachstum liegt.

Gegenüber dem vorigen Versuch erhöhte sich die maximale Wachstumsgeschwindigkeit um das Doppelte. Da die Sauerstoffverbrauchsrate im vergleichbaren Maße zunahm (Faktor 3), kann geschlossen werden, daß die größere Wachstumsgeschwindigkeit auf einer verstärkten oxidativen Energiegewinnung beruht.

Bacteriochlorophyllsynthese. Tab.IV 7 zeigt, daß die Bchl.-Synthese bei pO_2 8,6 Torr zum Stillstand kommt. In den darunter liegenden pO_2-Abschnitten nimmt die Bchl.-Syntheserate (Spalte 4 u.5) mit geringer werdendem pO_2 zu. Daraus kann geschlossen werden, daß die Bchl.-Synthese oberhalb von pO_2 8,6 Torr völlig reprimiert ist.

Unterhalb dieses pO_2-Grenzwertes könnte die Bchl.-Syntheserate, ähnlich wie bei Rp. acidophila, vom Sauerstoffpartialdruck abhängig sein in der Weise, daß jedem pO_2-Wert ein bestimmter spez. Bchl.-Gehalt zugeordnet ist. Entsprechend dem Abstand vom Bchl.-Sollwert dürften dann die Zellen die Bchl.-Syntheserate erhöhen oder verringern. Nach Erreichen des Sollwertes sollte nach diesem Modell die Zunahme des Bchl.-Gehaltes mit gleicher Rate erfolgen wie die Zunahme der übrigen Zellbestandteile.

Tab.IV 6: R.molischianum St.N 131. Abhängigkeit der Verdopplungszeit (t_d) vom Sauerstoffpartialdruck (pO_2) bei 1,6 - 8,6 Torr im Dunkeln und dazugehörige spezifische Sauerstoffverbrauchsrate (spez. vO_2).

Wachstumszeit mikroaerob-Dunkel (h)	pO_2 (Torr)	t_d (h)	spez. vO_2 (nmole · min^{-1} · $mgProt^{-1}$)
1,5	6,9	22,6	
3,6	8,6	65,3	1,7
8,1	1,6	29,2	0,9
12,0	6,0	22,8	31,5
26,0	4,7	24,3	41,3
39,0	2,9	24,6	32,2

Die Meßwerte stammen aus dem Wachstumsversuch in Abb.IV 19. Die Verdopplungszeit wurde aus der Zunahme der O.D. = E 691 nm (kontinuierliche Trübungsmessung) berechnet. Zur Ermittlung der spez. vO_2 wurden die aus Kjeldahl-Stickstoff berechneten Proteinwerte verwendet.

Der spezifische Bacteriochlorophyllgehalt der pO_2-Phasen unterhalb 8,6 Torr ist in diesem Versuch fast gleich (Tab. IV 7, Spalte 7). Legt man das oben entworfene Bchl.-Regulationsmodell zugrunde, so zeigte der Quotient t_d O.D./ t_d Bchl. von 0,62 (Spalte 6), daß bei pO_2 6,0 der spez. Bchl.-Gehalt über dem Sollwert liegt und der Quotient von 2,7 für pO_2 1,6 Torr, daß er hier unterhalb des Sollwertes liegt. Der Quotient von 1,2 im Abschnitt anaerob-Licht bedeutet, daß hier annähernd ein Sollwert erreicht ist. Die unterschiedlichen Verdopplungszeiten für O.D. und Bchl. bei gleichem pO_2 lassen sich durch dieses Regulationsmodell erklären.

Tab.IV 7: R.molischianum St.N 131 - Bacteriochlorophyll-bildung in Abhängigkeit vom Sauerstoffpartialdruck.

(1)	(2) pO_2 (Torr)	(3) t_dO.D. (h)	(4) t_dBchl. (h)	(5) Maximale Bchl.-Synthese- u. Abnahmerate (μg Bchl. $\cdot$ $ml^{-1} \cdot min^{-1}$)	(6) $\frac{t_d O.D.}{t_d Bchl.}$	(7) $\frac{Bchl.}{Prot.}$ $\left(\frac{\mu g}{mg}\right)$
anaerob-Licht	0,0	7,2	6,0	$7,4 \cdot 10^{-3}$	1,2	35
mikroaerob-Dunkel	1,6	29,2	10,9	$11,3 \cdot 10^{-3}$	2,7	36
"	6,0	22,8	36,6	$6,7 \cdot 10^{-3}$	0,62	37,5
"	8,6	65,3	-144,4	$-0,8 \cdot 10^{-3}$	-0,45	32

Die Meßwerte stammen aus dem Wachstumsversuch in Abb.IV 19. Die Berechnung der Verdopplungszeiten (t_d) für die O.D. erfolgte aus der Zunahme der O.D. bei E 691 nm (kontinuierliche Trübungsmessung).

Dieser Versuch zeigt erneut, daß ein andauerndes mikroaerobes Wachstum bei R.molischianum nur unter Bedingungen der Bchl.-Synthese ablaufen kann. Wenn trotz gleichbleibenden Bchl.-Gehalts ein langsames Wachstum gefunden wurde (Tab.IV 7, pO_2 8,6 Torr), so konnte dies nie über längere Zeit aufrecht erhalten werden (Vergl. Abb.IV 17, Abschnitt b).

b) Rhodospirillum fulvum

Die Wachstumsversuche mit R.molischianum und R.photometricum in Kap. C 3 zeigten, daß ein Zusammenhang zwischen der Sauerstofftoleranz bei Wachstum aerob im Licht und der bei Wachstum mikroaerob im Dunkeln besteht. R.fulvum konnte im Gegensatz zu R.molischianum und R.photometricum aerob im Licht bei atmosphärischem pO_2 wachsen (Kap.C 2), demzufolge sollte R. fulvum auch unter Wachstumsbedingungen mikroaerob im Dunkeln die höchste Sauerstofftoleranz innerhalb der braunen Rhodospirillen aufweisen. Die beiden im folgenden dargestellten Wachstumsversuche mit R.fulvum wurden deshalb bei höherem pO_2 durchgeführt.

Wie bei R.molischianum und R.photometricum ging es auch bei R.fulvum

1. um den Zusammenhang zwischen spez. Bchl.-Gehalt und der Bchl.-Synthese bei Wachstum mikroaerob im Dunkeln,
2. um die Bedingungen für ein andauerndes Wachstum mikroaerob im Dunkeln und
3. um die Frage, ob auch in diesem Fall ein pO_2-Optimum vorhanden ist.

Diese Fragen sollen anhand zweier Versuche geklärt werden, die bei unterschiedlichem pO_2 durchgeführt wurden; der erste bei pO_2 12 - 25 Torr (Abb.IV 20) und der zweite im pO_2-Bereich 3 - 12 Torr (Abb.IV 21).

α) pO_2 12 - 25 Torr (Abb.IV 20, Tab.IV 8)

In dem in Abb.IV 20 dargestellten Versuch mit R.fulvum wuchs die Kultur im gesamten pO_2-Bereich, und zwar ohne Unterbrechung bis etwa 130 h nach Versuchsbeginn. Danach nahmen sowohl O.D., Trockensubstanz und Protein ab als auch der Bchl.-Gehalt, dieser jedoch mit wesentlich höherer Rate. Der s p e z i f i s c h e Bchl.-Gehalt nahm während des ganzen

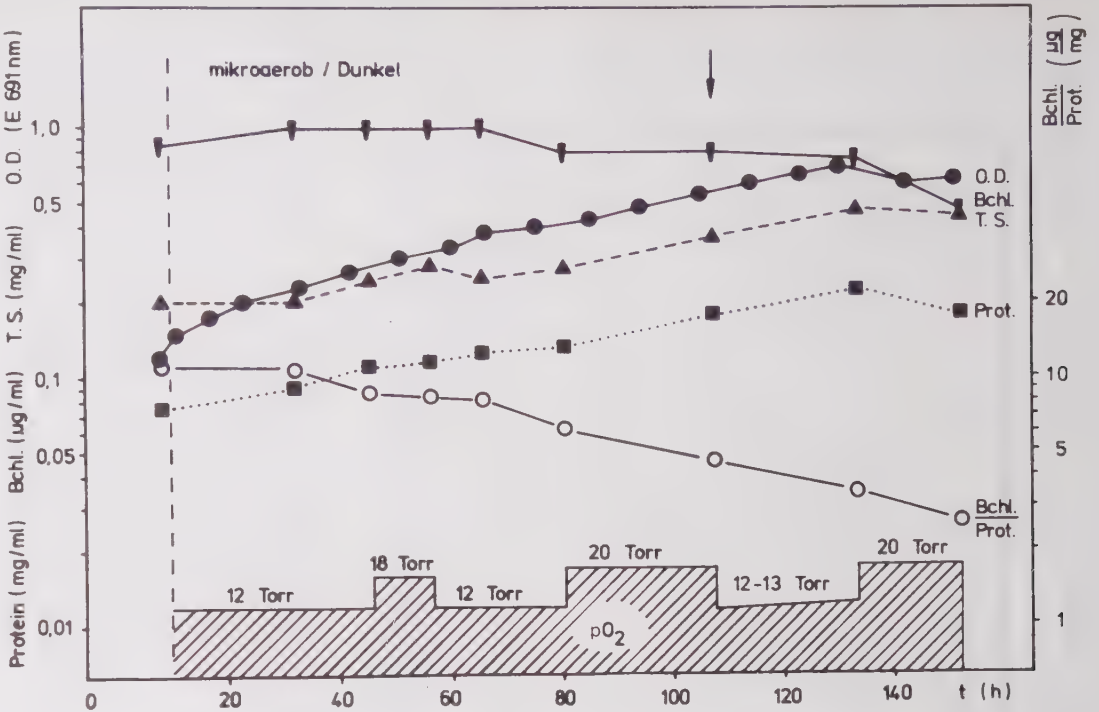


Abb.IV 20: Wachstum und Bchl.-Bildung von R.fulvum St.10060 mikroaerob im Dunkeln bei pO_2 12 - 25 Torr.

Das Wachstum erfolgte im Fermenter unter Standardbedingungen. Bis O.D. von E 0,13 Wachstum anaerob im Licht, dann Umschaltung auf Mikroaerob-Dunkel. Pfeil = Zugabe von 20 g Na-Succinat Am Ende des Wachstums O.D. = 0,69 und Bchl./Prot. = 3,42 g/mg.

Tab.IV 8: Abhängigkeit der Wachstumsgeschwindigkeit vom spezifischen Bacteriochlorophyllgehalt (Bchl./Prot.) und dem Sauerstoffpartialdruck (pO_2) bei R.fulvum St. 10060, mikroaerob im Dunkeln.

Zeit nach Umschaltung mikroaerob-Dkl. (h)	pO_2 (Torr)	t_d (h)	Bchl./Prot. (µg/mg)
vor Umschaltung	-	5	11,3
5	24,8	43	11,6
13	12,4	27	11,0
24	11,4	49	10,1
43	18,6	68	8,5
89	19,6	57	5,7
105	12,4	53	4,2
119	12,4	94	3,7
123	12,4	-	3,5
129	20,6	-54	3,4

Die Meßwerte stammen aus dem Wachstumsversuch Abb.IV 20. Die t_d wurde aus der Zu- oder Abnahme der O.D. = E 691 nm (kontinuierliche Trübungsmessung) berechnet.

Versuches kontinuierlich ab und erreichte bei Wachstumsstillstand den sehr geringen Wert von 3,5 µg/mg.

Tab.IV 8 veranschaulicht die Abhängigkeit der Wachstumsgeschwindigkeit vom pO_2 und dem spez. Bchl.-Gehalt. Die Verdopplungszeit verkürzte sich nur bei Umschaltung von der höchsten pO_2-Phase (24,8 Torr) auf die niedrigste pO_2-Phase (12,4 Torr). In den folgenden Wachstumsbereichen hatten die pO_2-Werte um 20 Torr eine etwas verlängerte t_d gegenüber pO_2 12,4 Torr, so daß mit ansteigendem pO_2, ähnlich wie bei

R.molischianum und R.photometricum, eine Abnahme der oxidativen Energiegewinnung vermutet werden kann.

Der pO_2-Bereich für das Wachstum im Dunkeln ist bedeutend höher als bei den übrigen braunen Rhodospirillen; die Wachstumsgeschwindigkeit ist jedoch mit der von R.molischianum im pO_2-Grenzbereich für das Wachstum im Dunkeln ($pO_2 > 8{,}4$ Torr, Tab.IV 6) vergleichbar.

Das plötzliche Aussetzen des Wachstums am Ende der Kultur bei unveränderten Bedingungen und Überschuß aller Nährstoffe ist nicht restlos geklärt. Vieles spricht aber dafür, daß mit 3,5 µg/mg ein unterer Grenzwert des spez. Bchl.-Gehaltes erreicht ist. Da der Pigmentgehalt ein Ausdruck ist für die Ausdehnung des intracytoplasmatischen Membransystems, kann angenommen werden, daß der Gehalt an Membranen, an denen der Elektronentransport der Atmung sicher größtenteils abläuft, unterhalb des Grenzwertes 3,5 µg/mg zur oxidativen Energiegewinnung nicht mehr ausreicht.

β) pO_2 3-12 Torr (Abb.IV 21)

Im Gegensatz zum vorangegangenen Wachstumsversuch war die B c h l.-S y n t h e s e nur in der ersten Hälfte des pO_2-Bereiches 9 - 12 Torr reprimiert. In diesem Teilabschnitt lag der pO_2 überwiegend bei 12 Torr und erreichte kurzfristig auch 15 Torr. In der zweiten Hälfte dieses pO_2-Bereiches, in dem der pO_2 immer unter 12 Torr geblieben war, nahm der Bchl.-Gehalt langsam zu. Im Vergleich dazu war die Bchl.-Synthese von R.molischianum im Dunkeln nur bei einem $pO_2 < 8$ Torr möglich.

Der spez. Bchl.-Gehalt erhöhte sich stark bei pO_2 3 Torr, blieb bei pO_2 6 Torr konstant und erhöhte sich geringfügig bei pO_2 8 - 9 Torr; im pO_2-Abschnitt 9 - 12 nahm er dagegen ab. Diese Änderungen des spez. Bchl.-Gehaltes lassen zunächst

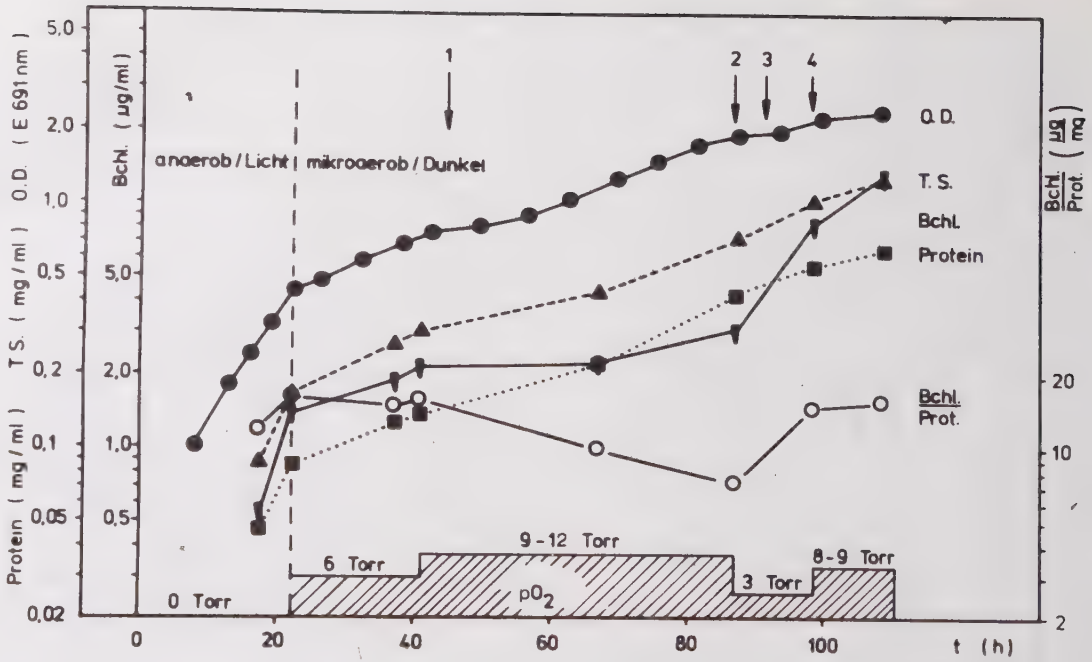


Abb.IV 21: Wachstum und Bchl.-Bildung von R.fulvum St.10060 mikroaerob im Dunkeln bei pO_2 3 - 12 Torr

Das Wachstum erfolgte unter Standardbedingungen im Fermenter. An den mit Pfeilen bezeichneten Stellen wurden zugegeben: 1 u. 2 = 10 g Na-Succinat, 3 = 7 g NH_4Cl und 4 = 20 g Na-Succinat + 7 g NH_4Cl. Beleuchtungsstärke anaerob-Licht = 4000 Lux (Siehe auch Abb.IV 26). Maximale O.D. E = 2,51.

keine Abhängigkeit vom pO_2 oberhalb von 6 Torr erkennen. Der Verlauf der spez. Bchl.-Kurve in Abb.IV 21 läßt vermuten, daß die Zunahme des spez. Bchl.-Gehaltes in den beiden pO_2-Phasen am Schluß des Versuches teilweise durch den dort vorherrschenden niedrigen Ausgangswert bedingt ist, der von dem für pO_2 3 Torr charakteristischen Sollwert besonders stark abweicht. Entsprechend läßt sich die Konstanthaltung des spez. Bchl.-Gehaltes bei pO_2 6 Torr und die langsame Zunahme in der pO_2-Phase mit 8 - 9 Torr erklären.

Diese pO_2 abhängige Regelung des spez. Bchl.-Gehaltes wurde ebenfalls in einem anderen, hier nicht abgebildeten Versuch gefunden: R.fulvum erreichte im Dunkeln in Abhängigkeit vom pO_2 folgende spez. Bchl.-Gleichgewichtspunkte (Sollwerte):

pO_2 4 Torr	22 µg/mg	(Bchl./Prot.)
" 6 "	17 "	"
" 9 "	13 "	"

(bei pO_2 > 11 Torr war die Bchl.-Synthese reprimiert).

Interessant ist, daß das Wachstum auch in diesem Versuch auch bei der relativ hohen Zellkonzentration (O.D. = E 2,5) nicht zum Stillstand kam. Da im vorangegangenen Versuch bei sonst gleichen Wachstumsbedingungen, aber erhöhtem pO_2, das Wachstum bei einer O.D. von E = 0,69 aufhörte, kann geschlossen werden, daß die Wachstumslimitierung dort tatsächlich mit dem zu gering gewordenen spez. Bchl.-Gehalt zusammenhängt.

Wachstumsgeschwindigkeit. Die Abhängigkeit der Wachstumsgeschwindigkeit und des spez. Bchl.-Gehaltes vom pO_2 ist in Tab. IV 9 dargestellt. Die geringste Verdopplungszeit wurde bei pO_2 11 Torr und die höchste im pO_2-Abschnitt 5 - 8 Torr festgestellt. Die pO_2-Phase mit 3 Torr wurde nicht in der Tabelle aufgeführt, da die dort erreichte hohe Zellkonzentration eine gewisse Wachstumslimitierung wahrscheinlich macht. Unter gleichen Wachstumsbedingungen, aber bei geringeren Zellkonzentrationen, wurden in einem weiteren Wachstumsversuch fol-

Tab.IV 9: R.fulvum, St.10060, Abhängigkeit der Wachstumsgeschwindigkeit mikroaerob im Dunkeln vom pO_2, im pO_2-Bereich von 5 bis 12 Torr.

Zeit nach Umschaltung auf mikroaerob-Dunkel (h)	pO_2 (h)	t_d (h)	Bchl./Prot. (µg/mg)
2	5	26,3	15,5
5,0	12	18,4	15,0
10,0	11	18,9	15,0
34,0	8	24,3	11,5
45,0	7	36,2	9,5
50,0	11	17,9	9,0

Die Meßwerte stammen aus dem Wachstumsversuch Abb.IV 21. Die t_d wurde aus der Zunahme der O.D. bei E 691 nm (kontinuierliche Trübungsmessung) berechnet.

gende Wachstumsgeschwindigkeiten in Abhängigkeit vom pO_2 erreicht:

pO_2 4 Torr	t_d 57 h
" 8 "	" 27 "
" 11 "	" 18 "

Diese Messungen zeigen eindeutig, daß das pO_2-Optimum von R.fulvum für das Wachstum im Dunkeln bei pO_2 11 Torr liegt, und damit wie bei R.molischianum im Grenzbereich zur Repression der Bchl.-Synthese.

Eine Abhängigkeit der Verdopplungszeit vom spez. Bchl.-Gehalt oder von der Wachstumszeit nach Umschaltung auf mikroaerob-Dunkel ist bei R.fulvum ebensowenig zu erkennen wie bei R.molischianum und R.photometricum.

D. Zusammenfassung und vergleichende Gegenüberstellung der Wachstumsversuche.

D 1. Wachstum anaerob im Licht

Der Einfluß der Lichtintensität auf Wachstum und Bacteriochlorophyllsynthese ist seit langem bekannt (z.B. CLAYTON, 1955 u. COHEN-BAZIRE et al., 1957). Die Untersuchungen erstrecken sich nur auf wenige Arten und beschränken sich meistens auf wenige charakteristische Daten. Der funktionale Zusammenhang zwischen Lichtintensität und Bchl.-Gehalt ist bisher noch bei keiner Art genau erfaßt worden.

Da das mikroaerobe Wachstum der braunen Rhodospirillen offenbar mit dem Pigmentgehalt der Zellen zusammenhängt, erschien es wichtig, die Regulation des spez. Bchl.-Gehaltes unter phototrophen Bedingungen genau zu untersuchen und mit den Befunden an einer fakultativ aeroben Art zu vergleichen.

In der Fermenterkultur herrschen insofern besondere Bedingungen, als die vorgegebene Beleuchtungsstärke nur bis zu einer bestimmten Zelldichte für Wachstum und Bchl.-Synthese ausschlaggebend ist. Später wird die photosynthetisch wirksame Lichtmenge durch Selbstbeschattung der Zellen laufend gemindert, und die Wachstumsgeschwindigkeit nimmt trotz des zunehmenden spez. Bchl.-Gehaltes langsam ab.

Die Wachstumsrate ist in der Regel verschieden von der Bchl.-Syntheserate, jedoch wird im Laufe der Kultur stets ein Punkt erreicht, an dem beide Raten identisch werden. Dieser Punkt wurde in der vorliegenden Arbeit als G l e i c h g e w i c h t s p u n k t bezeichnet (Vergleiche Abb.IV 3, nach ca. 25 h).

Wird die Beleuchtungsstärke während des Wachstums unter lichtbegrenzenden Bedingungen erhöht, so nimmt die Wachstumsgeschwin-

digkeit zu, und die Bchl.-Synthese wird reprimiert. Die kontinuierlich weiter zunehmende Zelldichte verringert dann wieder die auf die Zellen treffende Lichtmenge soweit, daß sich die Wachstumsgeschwindigkeit nicht mehr erhöht, und die Bchl.-Synthese wieder einsetzt. Zu diesem Zeitpunkt, der dem Gleichgewichtspunkt entspricht (Vergl.Abb.IV 4 nach 8 h), reicht der spez. Bchl.-Gehalt der Zellen gerade noch zur Aufnahme der nutzbaren Lichtquanten aus; er entspricht der für die Zelle maximal nutzbaren Lichtmenge.

In jeder der untersuchten Bakterienarten bildet der spezifische Bacteriochlorophyllgehalt bei einem bestimmten Verhältnis von O.D. und Beleuchtungsstärke, also bei der für die Zellen wirksamen Beleuchtungsstärke, einen c h a r a k t e r i s t i s c h e n W e r t, der dem spez. Bchl.-Gehalt am Gleichgewichtspunkt entspricht. Je nach der Größe der Differenz zwischen dem in der Kultur vorhandenen spez. Bchl.-Gehalt und dem durch die "effektive Beleuchtungsstärke" bestimmten charakteristischen Sollwert, erhöht bzw. verringert sich die Bchl.-Syntheserate mehr oder weniger stark.

Wurden z.B. Kulturen mit hohem spez. Bchl.-Gehalt und geringer O.D. mit einer hohen Beleuchtungsstärke bestrahlt, so wurde die Bchl.-Synthese, da der anfängliche spez. Bchl. weit über dem charakteristischen Wert lag, völlig reprimiert, wobei das Wachstum mit maximaler Rate erfolgte.

Wenn dagegen Starklichtkulturen mit geringem spez. Bchl.-Gehalt und hoher O.D. mit einer niedrigen Beleuchtungsstärke bestrahlt wurden, beanspruchte die dann verstärkt einsetzende Bchl.-Synthese voll den geringen photosynthetisch gewonnenen Energiebetrag, wodurch das Wachstum infolge Energiemangel zum Stillstand kam.

Die Effektivität der Beleuchtung nimmt, wie erwähnt, mit zunehmender Zelldichte ab. Diese Abnahme ist durch die zunehmende Lichtstreuung in der immer dichter werdenden Suspension be-

dingt. Die Streuung bewirkt eine Wegverlängerung des Lichtes, und da die Lichtstärke im Quadrat zur Weglänge abnimmt, ist der Lichtverlust durch Streuung nicht von der O.D. direkt, sondern von ihrem Quadrat abhängig. Die effektive Beleuchtungsstärke wurde daher wie folgt berechnet:

(5)

$$\text{Effektive Beleuchtungsstärke} = \frac{\text{Beleuchtungsstärke}}{\text{O.D.}^2} \; ; \; \frac{\text{lx}}{\text{E}^2}$$

In Abb. IV 22 ist die Abhängigkeit des spez. Bchl.-Gehaltes von der nach Gleichung 5 berechneten effektiven Beleuchtungsstärke dargestellt. Da alle drei braunen Rhodospirillen-Arten eine ähnliche Abhängigkeit des spez. Bchl.-Gehaltes von der effektiven Beleuchtungsstärke zeigten, wurden nur die Ergebnisse von R. molischianum verwendet und denen von Rp. acidophila gegenübergestellt. Vergleicht man die beiden Kurven der Abbildung im Bereich von 4000 bis 25000 lx/E^2, so fällt der stärker hyperbolische Kurvenverlauf von Rp. acidophila auf. Dies bedeutet, daß R. molischianum bei vergleichbarer effektiver Beleuchtungsstärke einen höheren spez. Bchl.-Gehalt hat als Rp. acidophila. Dieser Unterschied wird in Tab. IV 10 besonders deutlich: bei R. molischianum stellt sich ein

Tab.IV 10: Regulation des spezifischen Bacteriochlorophyllgehaltes durch die effektive Beleuchtungsstärke bei R. molischianum und Rp. acidophila

effektive Beleuchtungsstärke (lx/E^2)	spez. Bchl.-Gehalt Bchl./Prot. ($\mu g/mg$)	
	Rp.acidophila	R.molisch.
25.000	7	10
15.000	10	15
5.000	23	33

Die Werte sind den Kurven aus Abb.IV 22 entnommen. Berechnung der effektiven Beleuchtungsstärke nach Gleichung 5.

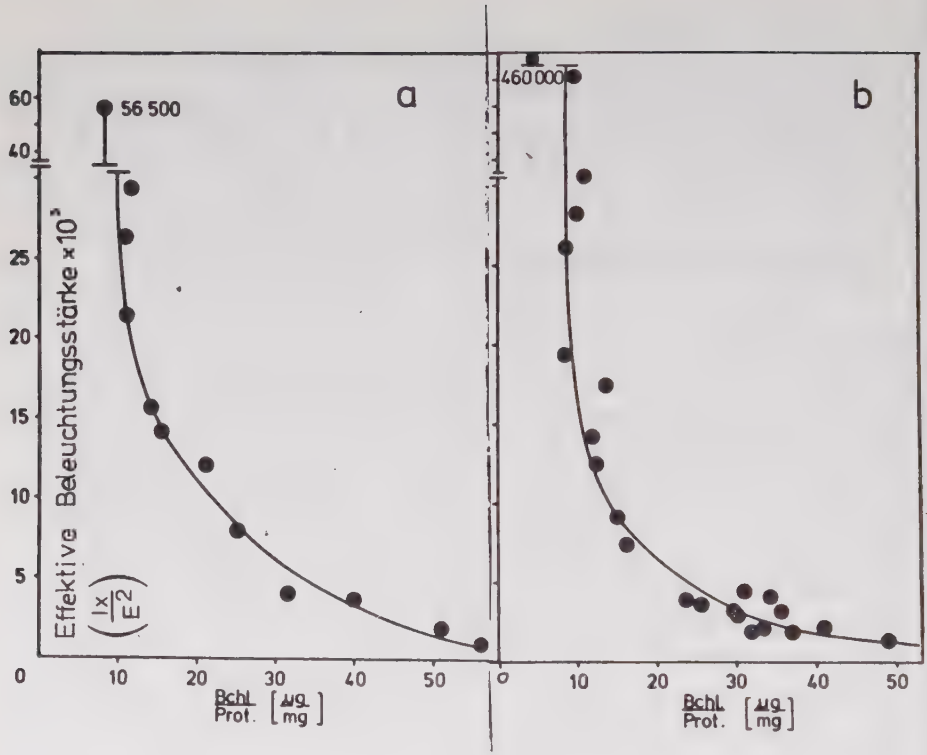


Abb.IV 22: Zusammenhang zwischen effektiver Beleuchtungsstärke und spezifischem Bacteriochlorophyllgehalt (Bchl./Prot.) von R.molischianum (a) und Rp. acidophila (b).

Das Wachstum erfolgte im Fermenter unter Standardbedingungen anaerob im Licht. Die spezifischen Bchl.-Werte wurden unter Gleichgewichtsbedingungen ermittelt: Nach Einstellung der Beleuchtungsstärke wurde der Zeitpunkt abgewartet, an dem die Bchl.-Synthese und die Synthese von T.S. und Prot. gleiche Raten erreichten. Die einzelnen Meßpunkte stammen z.T. aus verschiedenen Fermenteransätzen, sie stellen Mittelwerte aus drei parallelen Messungen dar.

um 30 % höherer charakteristischer spez. Bchl.-Gehalt ein. Auch in Bereichen mit hoher Beleuchtungsstärke verringerte sich der spez. Bchl.-Gehalt von R. molischianum nicht so stark wie der von Rp. acidophila.

Wurden Kulturen mit einem bestimmten charakteristischen Bchl.-Gehalt plötzlich einer geringeren effektiven Beleuchtungsstärke ausgesetzt, nahm die W a c h s t u m s g e s c h w i n d i g k e i t entsprechend der Verringerung der effektiven Beleuchtungsstärke ab, bis sich der neue charakteristische Bchl.-Gehalt eingestellt hatte. Danach veränderte sich die Wachstumsgeschwindigkeit nur geringfügig.

Es trifft wohl zu, daß eine Abnahme der effektiven Beleuchtungsstärke die auf die einzelne Zelle treffende Lichtmenge verringert und dadurch bei gleichbleibendem Photosynthesepigmentgehalt auch die aufgenommene Lichtmenge abnimmt. Da sich aber der Pigmentgehalt bei geringerer Beleuchtungsstärke erhöht, vergrößert sich auch der aufgenommene Lichtenergiebetrag.

Für das Wachstum wurde die effektive Beleuchtungsstärke (welche auch die Lichtstreuung durch die Zellen berücksichtigt), durch den Quotienten Beleuchtungsstärke/O.D. (lx/E) ersetzt, welcher nur den Lichtverlust durch die Absorption der Zellen berücksichtigt. Dies war deshalb möglich, weil die Streulichtverluste durch vermehrte Aufnahme von Lichtquanten infolge der zusätzlichen Photosynthesepigmentbildung ersetzt werden können und daher keinen nennenswerten Einfluß auf die Wachstumsgeschwindigkeit haben sollten.

Die Verdopplungszeit veränderte sich in einem weiten Bereich (70.000 bis 25.000 bzw. 1500 lx/E) der auf die O.D. bezogenen

Beleuchtungsstärke (im folgenden korrigierte Beleuchtungsstärke genannt) verhältnismäßig wenig (Abb.IV 23), erst im unteren Bereich nahm sie abrupt zu, und zwar unterschiedlich für Kulturen mit hoher (E 2,8 - 3,02) und niedriger (E 0,1 - 1,8) O.D. Diese Abnahme der Wachstumsgeschwindigkeit kennzeichnet die Bereiche, an denen die vorhandene Lichtmenge fast nur noch für den Erhaltungsstoffwechsel ausreichte. Der spezifische Bacteriochlorophyllgehalt steigt auch unter diesen Bedingungen noch an. Die zur Verfügung stehenden Lichtquanten reichen aber nicht aus, um die Kapazität des Pigmentsystems voll zu nutzen. In Kulturen mit hoher Zellkonzentration (O.D.) ist der Erhaltungsbedarf der Kultur größer, so daß das Wachstum schon bei einer sehr viel höheren Beleuchtungsstärke zum Stillstand kommt. Aus der geringen Veränderung der Wachstumsgeschwindigkeit im übrigen Bereich der korrigierten Beleuchtungsstärke unterhalb der Lichtsättigung kann geschlossen werden, daß die Verringerung der Beleuchtungsstärke durch die Lichtabsorption und Streuung der Zellen in einem weiten Bereich durch die vermehrte Photosynthesepigmentbildung kompensiert werden kann.

Sowohl bei R. molischianum als auch bei R. fulvum zeigte sich eine mit Rp. acidophila vergleichbare Abhängigkeit der Verdopplungszeit von der korrigierten Beleuchtungsstärke. Unterschiedlich hingegen waren die Grenzwerte für die Lichtsättigung, also der Bereich, bei welchem mit weiterer Steigerung der Lichtintensität keine weitere Zunahme der Wachstumsgeschwindigkeit mehr möglich war. Dieser Grenzwert wurde bei R. molischianum bei einer niedrigeren korrigierten Beleuchtungsstärke ($300 \cdot 10^3$ lx/E) erreicht als bei Rp. acidophila ($480 \cdot 10^3$ lx/E). In diesem Grenzbereich hatten R. molischianum und Rp. acidophila fast gleich hohe Wachstumsgeschwindigkeiten, was bedeutet, daß R. molischianum für eine bestimmte Wachstumsgeschwindigkeit eine geringere korrigierte Beleuchtungsstärke benötigt als Rp. acidophila. Dies kommt nicht

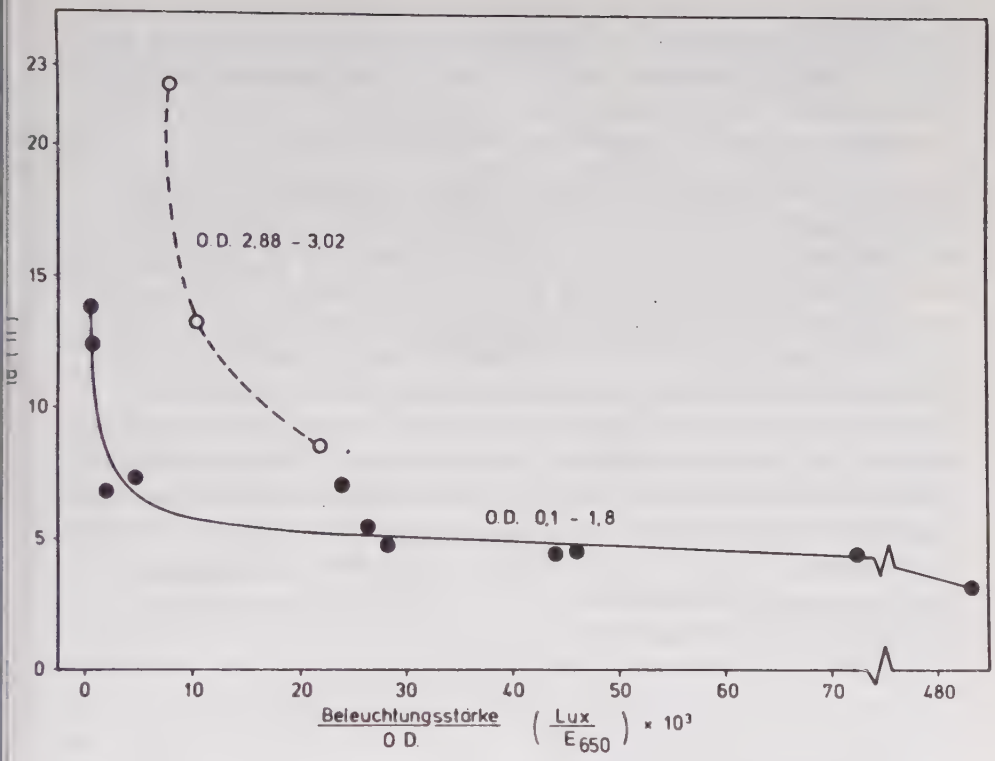


Abb.IV 23: Zusammenhang zwischen der korrigierten Beleuchtungsstärke (Beleuchtungsstärke/O.D.) und der Verdopplungszeit der O.D. (t_d) bei Rp. acidophila St.7050.

Das Wachstum erfolgte im Fermenter unter Standardbedingungen anaerob im Licht. Die einzelnen Meßpunkte entstammen verschiedenen Fermenteransätzen, sie wurden Wachstumsbereichen entnommen, an denen sich ein charakteristischer spez. Bchl.-Wert (s.Text) eingestellt hatte.

dadurch zustande, daß R. molischianum einen höheren Ausnutzungsgrad der Lichtquanten zur Produktion von Zellsubstanz hat als Rp. acidophila, sondern dadurch, daß R. molischianum durch den höheren spez. Bchl.-Gehalt mehr Lichtquanten bei gleicher Beleuchtungsstärke aufnehmen kann als Rp. acidophila.

Ein weiterer Unterschied zwischen Rp. acidophila und R. molischianum zeigte sich bei einer Erhöhung der Beleuchtungsstärke über die Lichtsättigung hinaus. Während bei Rp. acidophila die Wachstumsgeschwindigkeit dann konstant blieb, verlangsamte sich das Wachstum bei R. molischianum mit steigender Lichtintensität (s.Abb.IV 13). Es kann vermutet werden, daß hier eine Verminderung der photosynthetischen Energiegewinnung durch Photooxidation stattfindet. Möglicherweise steht dies im Zusammenhang mit der Inaktivierung der oxidativen Energiegewinnung durch wachstumshemmende höhere Sauerstoffpartialdrücke und dem dabei auftretenden Abbau von Bchl., was für keine der untersuchten fakultativ aeroben Rhodospirillaceae (Rp. acidophila; Rp. sphaeroides COHEN-BAZIRE et al. 1957; Rp. capsu lata DREWS et al. 1969) zutrifft.

D 2. Wachstum aerob im Dunkeln

Unter aeroben Wachstumsbedingungen im Dunkeln ist die Energiegewinnung vom Sauerstoff abhängig, die Menge des vorhandenen Sauerstoffs (die im Sauerstoffpartialdruck zum Ausdruck kommt) hat deshalb eine ähnliche regulatorische Funktion für die Wachstumsgeschwindigkeit wie die Lichtmenge bei phototrophem Wachstum.

Fermenterkulturen von Rp. acidophila zeigten dann auch, daß eine konstante Sauerstoff-Begasungsrate die gleiche Wirkung auf die Wachstumsgeschwindigkeit und den Bchl.-Gehalt hatte, wie eine konstante Beleuchtungsintensität unter anaeroben Bedingungen im Licht, nämlich eine Zunahme des spez. Bchl.-

Gehaltes verbunden mit einer Abnahme der Wachstumsgeschwindigkeit.

Nach dem Aufbau der pO_2-Regelanlage wurde der laufend zunehmende Sauerstoffverbrauch während des Wachstums automatisch durch Erhöhung der Begasungsrate kompensiert. Unter phototrophen Bedingungen würde dies einer ständigen Anpassung der Beleuchtungsstärke an den zunehmenden Lichtquantenbedarf der entsprechen, so daß die Konstanthaltung des pO_2 der Aufrechterhaltung einer effektiven Beleuchtungsstärke gleichzusetzen wäre.

Wenn Rp. acidophila bei konstantem pO_2 kultiviert wurde, so erreichten die Kulturen nach etwa 10 h Wachstumszeit einen Punkt (Gleichgewichtspunkt), von dem ab sich der spez. Bchl.-Gehalt nicht weiter veränderte; die Verdopplungszeiten für Bchl. und Protein erreichten hier gleiche Werte. Die Höhe des spez. Bchl.-Gehaltes und der Wachstumsgeschwindigkeit nach Erreichung des Gleichgewichtspunktes waren vom pO_2 abhängig, wie in Abb.IV 24 dargestellt. Die Verdopplungszeiten (Kurve a) sind bei niedrigem pO_2 am längsten (12,5 h) und im Bereich des atmosphärischen pO_2 am kürzesten (5,0 h); darüber nehmen sie wieder etwas zu.

Der spezifische Bacteriochlorophyllgehalt ist in ähnlicher Weise vom pO_2 abhängig (Kurve b). Vergleicht man den spez. Bchl.-Gehalt mit der Wachstumsgeschwindigkeit, so ergibt sich, daß die beiden Größen vom Sauerstoffpartialdruck in entgegengesetzter Weise reguliert werden.

Quantitative Beziehungen zwischen Sauerstoffpartialdruck, Wachstumsgeschwindigkeit und Bchl.-Synthese sind bisher nur für R. rubrum (BIEDERMANN et al. 1967) und Rp. capsulata (DREWS et al. 1969) veröffentlicht worden. In beiden Arten zeigt die Kurve für den spez. Bchl.-Gehalt einen ähnlichen Verlauf wie bei Rp. acidophila. Alle drei Arten weisen eine

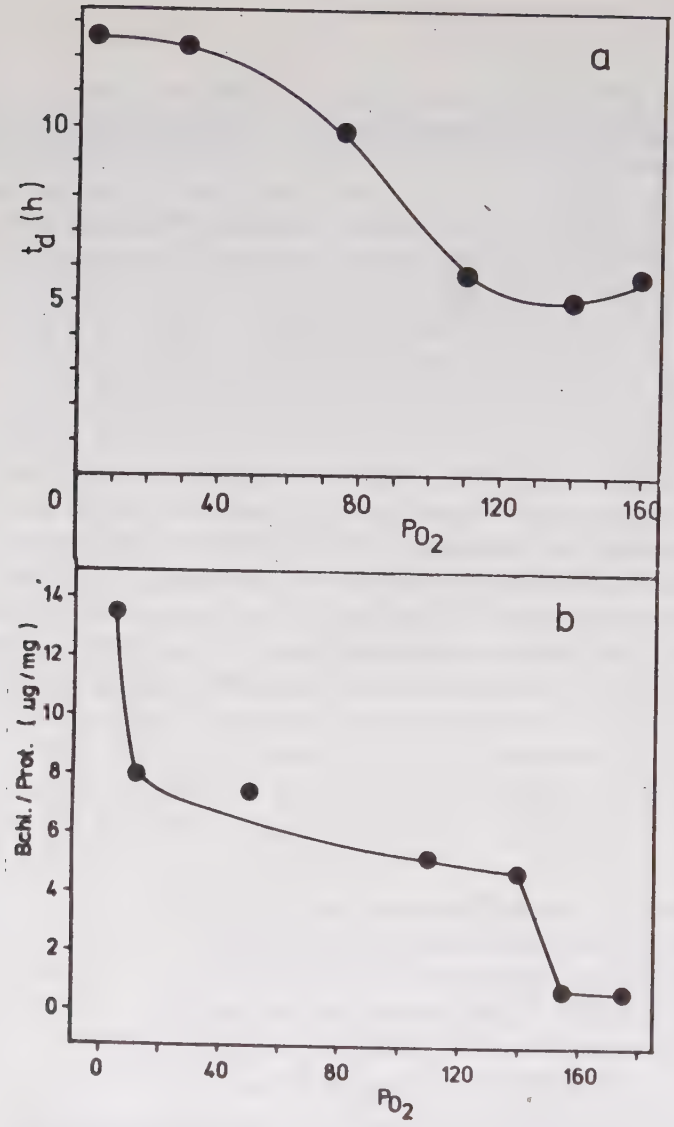


Abb.IV 24: Abhängigkeit der Verdopplungszeit für O.D. (t_d) und des spez. Bchl.-Gehaltes (Bchl./Prot.) vom Sauerstoffpartialdruck (pO_2) bei Rp. acidophila.

Das Wachstum erfolgte im Fermenter unter Standardbedingungen aerob im Dunkeln. Die einzelnen Meßpunkte entstammen z.T. verschiedenen Wachstumsversuchen. Die t_d wurde etwa 10 h nach Beginn des Versuches gemessen. Der spez. Bchl.-Gehalt wurde nach Erreichung von Gleichgewichtsbedingungen ermittelt.

starke Zunahme des spez. Bchl.-Gehaltes bei Absenkung des pO_2 im mikroaeroben Bereich auf. Bei Erhöhung des pO_2 fällt der spez. Bchl.-Gehalt in einem bestimmten pO_2-Bereich relativ steil auf den niedrigsten Wert ab. Dieser Bereich liegt bei Rp. capsulata bei 100 Torr, bei Rp. acidophila bei 130 - 140 Torr (Abb.IV 24), bei R. rubrum ist dieser bereits bei 8 Torr nahezu erreicht.

Die Wachstumsgeschwindigkeit veränderte sich im Gegensatz zu Rp. acidophila bei Rp. capsulata und R. rubrum nur geringfügig mit dem pO_2; trotzdem läßt sich bei allen drei Arten ein Wachstumsoptimum ermitteln. Es liegt bemerkenswerterweise gerade in dem pO_2-Bereich, in dem der spez. Bchl.-Gehalt auf den niedrigsten Wert abfällt.

Bei den drei Arten der braunen Rhodospirillen war ein aerobes Wachstum im Dunkeln nur bei niedrigem pO_2, unter mikroaeroben Bedingungen möglich. Der pO_2-Bereich für das aerobe Wachstum konnte nur schwer abgegrenzt werden, da eine Zunahme der Zellsubstanz in einem relativ breiten mikroaeroben Bereich möglich war. Wenn das Wachstum über mehrere Tage verfolgt wurde, stellte sich jedoch heraus, daß ein andauerndes Wachstum auf einen sehr engen pO_2-Bereich beschränkt war. Oberhalb dieses Bereiches kam das Wachstum spätestens nach einer Verdopplung zum Stillstand. Dies äußerte sich schon vorher in einer zunehmenden Verlängerung der Verdopplungszeit (Abb.IV 25). Die obere pO_2-Grenze für andauerndes Wachstum war bei R. molischianum niedriger als bei R. fulvum (7 bzw. 11 Torr).

Das andauernde mikroaerobe Wachstum war bei allen drei braunen Rhodospirillen von einer Bchl.-Synthese begleitet. Der absolute Bchl.-Gehalt hatte keinen Einfluß auf den wachstumsbegrenzenden pO_2-Wert, obwohl ein Mindestgehalt an Bchl. sicher notwendig ist (vergl. C 4 b).

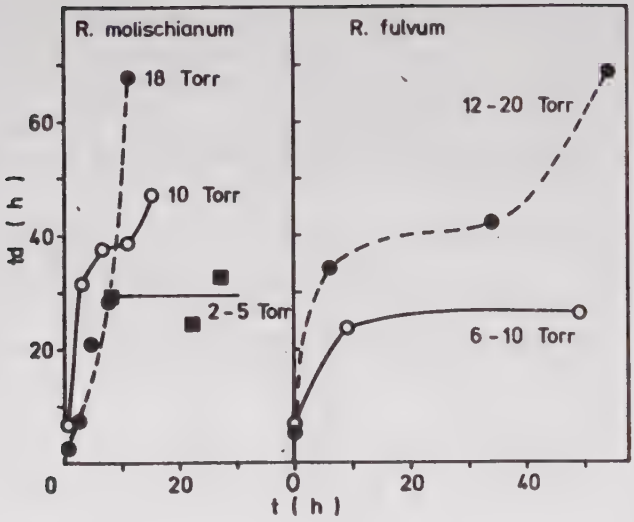


Abb.IV 25: Änderung der Verdopplungszeit (t_d) nach Umschaltung von anaerob-Licht auf mikroaerob-Dunkel bei R. molischianum St. N 131 und R. fulvum St. 10060.

Das Wachstum erfolgte im Fermenter unter Standardbedingungen. Zum Zeitpunkt t_o wurden die Wachstumsbedingungen von anaerob-Licht auf mikroaerob-Dunkel geändert. Die Wachstumsversuche in den jeweiligen pO_2-Bereichen wurden in getrennten Fermenteransätzen durchgeführt.

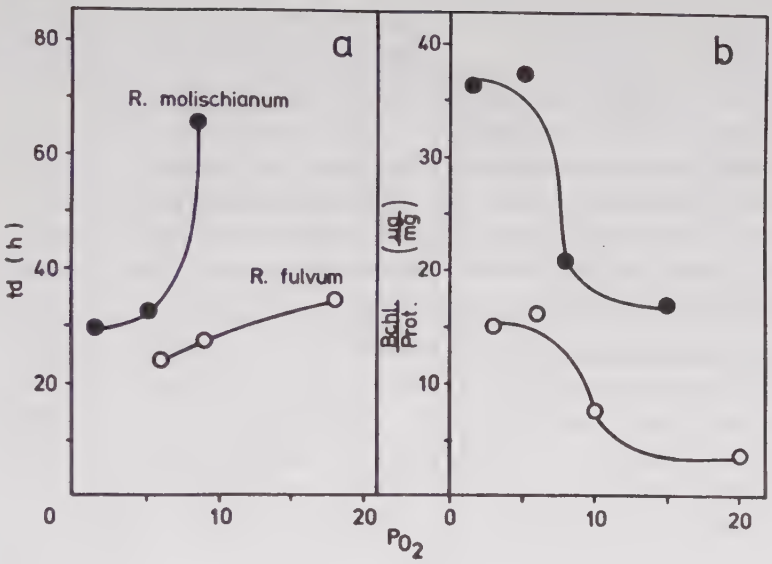


Abb.IV 26: Abhängigkeit der Verdopplungszeit für O.D. (t_d) und des spez. Bchl.-Gehaltes (Bchl./Prot.) brauner Rhodospirillen vom Sauerstoffpartialdruck (pO_2).

Das Wachstum erfolgte im Fermenter unter Standardbedingungen mikroaerob im Dunkeln. Die Verdopplungszeit wurde etwa 10 h nach Umschaltung von anaerob-Licht auf mikroaerob-Dunkel ermittelt, der spez. Bchl.-Gehalt erst nach Einstellung von Gleichgewichtsbedingungen (s.Abb.IV 22). Die einzelnen Werte entstammen aus folgenden Wachstumsversuchen:

		a	b
R. molischianum	St.N 131 (Abb.)	IV 14	IV 12 u.14
R. fulvum	St.10060	" " 17 u.18	" 17 u.18

Die Abhängigkeit der Wachstumsgeschwindigkeit und des spez. Bchl.-Gehaltes vom pO_2 ist in Abb.IV 26 dargestellt. Naturgemäß erreichten nur die t_d- und die Bchl.-Werte im unteren pO_2-Bereich einen Gleichgewichtszustand, bei welchem sie sich nicht weiter veränderten (vergl. auch Abb.IV 25). Der spez. Bchl.-Wert, der sich unter diesen Bedingungen (pO_2 6-7 Torr) einstellte, war für R. molischianum etwa doppelt so hoch wie für R. fulvum. Die kürzesten Verdopplungszeiten für O.D. waren dagegen nicht wesentlich verschieden (R. molischianum 22 h und R. fulvum 18 h).

Bei R. photometricum ließ sich eine Bchl.-Synthese unter aeroben Bedingungen im Dunkeln erst unterhalb von pO_2 4 Torr nachweisen, ohne daß dabei ein Wachstum zustande kam. Das läßt darauf schließen, daß die bei diesem pO_2 gewonnene Energiemenge so gering war, daß sie ganz für die Bchl.-Synthese in Anspruch genommen wurde. Die Ergebnisse der Kultur unter mikroaeroben Bedingungen im Licht (C 3 a) machen es in Analogie zu R. fulvum und R. molischianum wahrscheinlich, daß unterhalb von pO_2 4 Torr noch Wachstum möglich ist.

Faßt man die Ergebnisse der aeroben Wachstumsversuche im Dunkeln zusammen, so ergibt sich für die untersuchten Arten, daß nur Rp. acidophila bei atmosphärischem pO_2 zu wachsen vermag, die braunen Rhodospirillen dagegen bereits bei 10 % des atmosphärischen pO_2 im Wachstum gehemmt werden. Tab.IV 11 zeigt die bereits festgestellte Abfolge der Sauerstoffempfindlichkeit bei den 3 braunen Rhodospirillen. Die obere pO_2-Grenze für andauerndes Wachstum (Spalte 3) ist identisch mit dem höchsten Sauerstoffpartialdruck, bei dem noch eine Bchl.-Synthese stattfinden kann (Spalte 1) und stellt zugleich das Optimum für das aerobe Wachstum im Dunkeln dar (Spalte 4).

Tab.IV 11: Abhängigkeit der Bchl.-Synthese und des Wachstums vom pO_2 im Dunkeln bei Rhodospirillaceae.

	pO_2-Bereich für Bchl.-Synthese	Wachstum		
		kurzfristig	andauernd	Optimum
	pO_2 (Torr) (1)	pO_2 (Torr) (2)	pO_2 (Torr) (3)	pO_2 (Torr) (4)
Rp.acidophila	< 140	-	< 170	140-150
R.fulvum	< 11	< 20	< 11	11
R.molischianum	< 7	10-15	< 6-7	7
R.photometricum	< 4	< 4	< 4	-

Die Werte sind aus den Versuchen in Kap. B u.C und weiteren nicht beschriebenen Wachstumsversuchen berechnet. Die Versuche wurden im Fermenter bei konstantem pO_2 im Dunkeln durchgeführt.

D 3. Wachstum aerob im Licht.

Von den braunen Rhodospirillen war nur R. fulvum in der Lage, ein Wachstum bei atmosphärischem pO_2 im Licht durchzuführen. Die stetige Abnahme der Wachstumsgeschwindigkeit bei gleichzeitiger Abnahme des Bchl.-Gehaltes zeigte, daß hier eine photosynthetische Energiegewinnung vorherrschend war.

R. molischianum und R. photometricum konnten aerob im Licht nur im mikroaeroben pO_2-Bereich wachsen und zwar im gleichen Bereich, der auch ein kurzfristiges Wachstum mikroaerob im Dunkeln ermöglichte. Bei R. molischianum stellte sich an der

oberen Grenze dieses Bereiches (pO_2 15 Torr) ein kurzfristiges Wachstum ohne Bchl.-Synthese ein, und zwar in dem Bereich, der auch im Dunkeln nur ein kurzfristiges Wachstum ermöglichte. Die obere pO_2-Grenze für längerfristiges Wachstum und Bchl.-Synthese lag im Licht um 1 bis 2 Torr höher als im Dunkeln (Tab. IV 12).

Tab.IV 12: Obere pO_2-Grenze für Wachstum und Bchl.-Synthese aerob im Licht bei braunen Rhodospirillen.

	Bchl.-Synthese (Torr)	Obere pO_2-Grenze für kurzfristiges Wachstum (Torr)	Obere pO_2-Grenze für längerfristiges Wachstum (Torr)
R.fulvum	-	-	159
R.molischianum	9	15	9
R.photometricum	-	5	5

Die Werte sind aus den Wachstumsversuchen in Kap. C 2 und C 3 entnommen. Die Versuche wurden im Fermenter bei konstantem pO_2 und Beleuchtungsstärke durchgeführt.

Sowohl bei R.photometricum als auch bei R. molischianum bewirkte die gleichzeitige Anwesenheit von Sauerstoff und Licht eine Erhöhung der Wachstumsgeschwindigkeit gegenüber Wachstum anaerob im Licht, was auf eine Addition der photosynthetischen und der oxidativen Energiegewinnung (additive Energiegewinnung) schließen läßt. Dieser Effekt wurde auch bei fakultativ aeroben Rhodospirillaceae gefunden (COHEN-BAZIRE et al. 1957). Messungen der spez. Sauerstoffverbrauchsrate bei R. molischianum ergaben, daß mikro-

aerob im Licht auch die photosynthetische Energiegewinnung vorherrscht. Somit hat das aerobe Wachstum im Licht bei R. molischianum den gleichen Charakter wie bei R. fulvum, obwohl R. molischianum bei höherem Sauerstoffpartialdruck im Licht wie im Dunkeln gehemmt wird.

V. EXPERIMENTE UND ERGEBNISSE ZUM ELEKTRONENTRANSPORT

Die vergleichenden Untersuchungen zur Wachstumsphysiologie (Kap. IV) zeigten, daß ein aerobes Wachstum und damit eine oxidative Energiegewinnung bei Rp. acidophila weitgehend unabhängig vom jeweiligen Photosynthesepigmentgehalt der Zellen war. Die elektronenmikroskopischen Aufnahmen von Dünnschnitten ließen bei voll aerob kultivierten Zellen keine Ausbildung eines intracytoplasmatischen photosynthetischen Membransystems erkennen. Beide Befunde zeigen, daß das voll aerobe Wachstum bei Rp. acidophila weitgehend unabhängig von der Ausbildung eines photosynthetischen Systems zur Energiegewinnung ist.

Oxidative und photosynthetische Energiegewinnung laufen demnach an unterschiedlichen Strukturen in der Zelle ab. Das Wachstum aerob im Dunkeln erfolgte im Vergleich zu den braunen Rhodospirillen mit relativ hoher Geschwindigkeit, jedoch mit geringerer Rate als bei photosynthetischer Energiegewinnung. Die oxidative Energiegewinnung (im Bereich der Cytoplasmamembran) kann also die photosynthetische (im intracytoplasmatischen Membransystem) nicht voll ersetzen.

Befunde an R. rubrum (THORE et al., 1967), Rp. sphaeroides (SASAKI, MOTOKAWA und KIKUCHI, 1970) und Rp. capsulata (KLEMME u. SCHLEGEL, 1968; MARRS u. GEST, 1973) zeigten, daß bei fakultativ aeroben Rhodospirillaceae der Wechsel von phototrophem auf chemotrophes Wachstum mit einer qualitativen und quantitativen Änderung der ETS-Komponenten verbunden ist. Auch der Ablauf der Phosphorylierung ist davon betroffen:
YAMASHITA et al. (1967) fanden im zellfreien System von R. rubrum eine oxidative und eine photosynthetische Phosphorylierung mit NADH als Elektronendonator, welche sich durch ihr pH-Optimum unterschieden und unterschiedlich durch o-Phenanthrolin gehemmt wurden.

Im Vergleich zu den bisher untersuchten fakultativ aeroben Rhodospirillaceae ist das aerobe Wachstum von Rp. acidophila

langsamer als das phototrophe Wachstum. Es erschien deshalb lohnend, die oxidativen Elektronentransportsysteme phototroph und chemotroph kultivierter Zellen von Rp. acidophila zu untersuchen.

Elektronenmikroskopische Untersuchungen an braunen Rhodospirillen (F. MAYER, Göttingen) zeigten, daß das intracytoplasmatische Membransystem mikroaerob im Dunkeln gewachsener Zellen voll ausgebildet war. Die Wachstumsgeschwindigkeit der braunen Rhodospirillen war bei mikroaerobem Wachstum um den Faktor 6 - 8 langsamer als bei phototrophem Wachstum; bei Rp. acidophila jedoch nur um den Faktor 2. Das intracytoplasmatische Membransystem von Rp. acidophila verdünnt sich beim Wechsel von anaerob-Licht auf aerob-Dunkel allmählich mit dem Wachstum aus. Es kann daher angenommen werden, daß die Energiegewinnung der braunen Rhodospirillen nicht an der gleichen Elektronentransportkette abläuft wie bei den fakultativ aeroben Arten. In Kap. I wurden dazu folgende Alternativen gegeben: Die oxidative Energiegewinnung erfolgt mit dem unveränderten photosynthetischen ETS bzw. mit einem geringfügig modifizierten, oder es wird ein neues oxidatives ETS mit einer relativ geringen Effektivität gebildet. Eine Entscheidung zwischen diesen Alternativen sollte durch einen Vergleich der Eigenschaften des Elektronentransportsystems phototroph kultivierter brauner Rhodospirillen mit dem chemotroph kultivierter Zellen herbeigeführt werden.

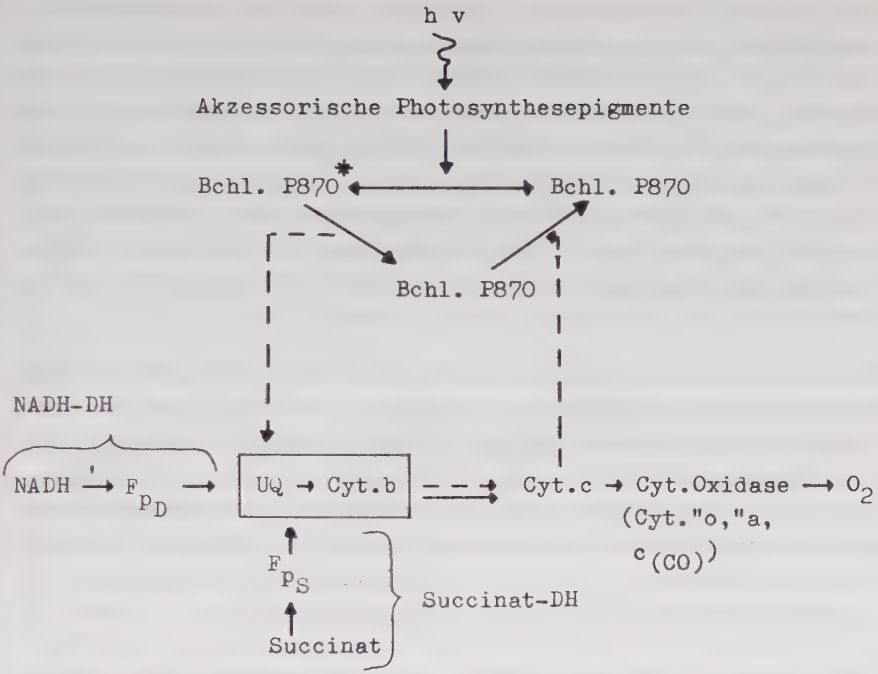
Im oxidativen Elektronentransportsystem, das der Atmungskette entspricht, werden Reduktionsäquivalente aus dem katabolischen Stoffwechsel stufenweise über die Enzyme des ETS auf ein niedrigeres Energieniveau gebracht und schließlich auf Sauerstoff übertragen. Ein hoher Anteil der freiwerdenden Energie wird dabei in der energiereichen Phosphatbindung des ATP konserviert. Die Atmungskette kann daher als eine Sukzession von Redox-Reaktionen der ETS-Komponenten angesehen werden. An diesen Reaktionen sind, bei Sauerstoff als Endakzeptor, im wesentlichen folgende Oxidations-Reduktionsenzyme beteiligt: Mit

Pyridin-Nukleotid gekoppelte Dehydrogenasen (DH), mit Flavin-Nukleotid gekoppelte DH und Cytochrome.

Auch die bakterielle photosynthetische Phosphorylierung bedingt eine Sukzession von Redox-Reaktionen, bei welchen z. T. die gleichen Oxidations-Reduktionsenzyme beteiligt sind. Die Bereitstellung von Reduktionsäquivalenten erfolgt aber hier über die Bacteriochlorophylle und Carotinoide.

Für das aerobe Wachstum ist im Endeffekt weniger der Aufbau des ETS als das Ergebnis, nämlich die Phosphorylierungsrate entscheidend. Quantitative Bestimmungen von Phosphorylierungsraten in vitro führen nicht immer zu verläßlichen Ergebnissen, weshalb ein derartiger Nachweis nicht zur Charakterisierung der oxidativen Energiegewinnung herangezogen wurde. Die Phosphorylierungsraten kommen in den Verdopplungszeiten der Zellen zum Ausdruck und können damit aus den Wachstumsversuchen abgeleitet werden.
Während sich die Wachstumsgeschwindigkeiten der braunen Rhodospirillen und Rp. acidophila bei phototropher Energiegewinnung nicht wesentlich unterscheiden, ist das chemotrophe Wachstum bei den braunen Rhodospirillen unter mikroaeroben Bedingungen wesentlich langsamer als bei Rp. acidophila: Bei einem pO_2 von 4 - 8 Torr benötigte R. fulvum 18 h für eine Verdopplung der O.D. und R. molischianum 23 h, Rp. acidophila dagegen nur 12 h.

Das schwächere Wachstum der braunen Rhodospirillen unter aeroben Bedingungen könnte einerseits auf einer ungenügenden Bereitstellung von Reduktionsäquivalenten durch den katabolischen Stoffwechsel beruhen, andererseits auf eine Limitierung der Übertragung von Reduktionsäquivalenten auf den Sauerstoff zurückzuführen sein.
Die erste Annahme ist wenig wahrscheinlich, da die NADH-gekoppelten Dehydrogenasen, die bei der oxidativen Energiegewinnung beteiligt sind, auch anaerob im Licht im Zuge der nichtcyclischen Photophosphorylierung gebildet werden. Da die Raten der photosyn-



Schema V 1: Elektronentransportschema der Rhodospirillaceae, nach THORE et al., 1969; CELLARIUS, 1969 und MOTOKAWA u. KIKUCHI, 1966, zusammengestellt.

– – – – = Photosynthetisches cyclisches ETS

——— = Oxidatives ETS

thetischen Energiegewinnung sich aber, wie die Verdopplungszeiten zeigen, bei Rp. acidophila und den braunen Spirillen nicht wesentlich unterscheiden, können die NADH-gekoppelten Dehydrogenasen nicht der limitierende Faktor für das verzögerte aerobe Wachstum der braunen Rhodospirillen sein. Deshalb ist anzunehmen, daß die oxidative Energiegewinnung der braunen Rhodospirillen im nachfolgenden Elektronentransport limitiert ist, welcher mit den Flavinnukleotid-gekoppelten Dehydrogenasen beginnt und über die nachfolgenden cytochromabhängigen Redox-Reaktionen zum Sauerstoff führt (Schema V 1).

Der Weg der Reduktionsäquivalente vom NADH einerseits und dem Succinat andererseits sollte zunächst unabhängig von den beteiligten Redox-Reaktionen als Ganzes untersucht werden. Er wird durch das NADH-Oxidase-System und dem Succinat-Oxidase-System dargestellt. In Anlehnung an die Nomenklatur anderer Autoren (TANIGUCHI u. KAMEN, 1965; JONES u. REDFEARN, 1966; SAUNDERS u. JONES, 1973) werden die beiden Enzymsysteme im folgenden als NADH- und Succinat-Oxidase bezeichnet.

Der gesamte Elektronentransport der Rhodospirillaceae, der aus verschiedenen Veröffentlichungen zusammengestellt wurde, ist in Schema V 1 dargestellt. Es zeigt, daß neben dem Ubichinon die Cytochrome und Cytochromoxidasen ausschlaggebend für die Weiterleitung der Reduktionsäquivalente im NADH- und Succinat-Oxidase-Enzymsystem zum Sauerstoff sind. Die Cytochromoxidasen, die die Elektronenübertragung auf den Elektronenendakzeptor Sauerstoff vermitteln, sind insofern bedeutsam, als sie für die Sauerstoffaffinität des ETS verantwortlich sind (TANIGUCHI u. KAMEN, 1965; KIKUCHI u. MOTOKAWA, 1968). Neben der Erfassung der Cytochrom-Oxidase und der Redox-Reaktionen zwischen NADH und Cytochrom c in Form der NADH-Cyt.c-Reduktase wurde eine Charakterisierung der einzelnen Cytochrome angestrebt und versucht, ihre Lokalisation in der Zelle zu bestimmen. Es ist bekannt, daß bestimmte Cytochrome gleichermaßen in der cyclischen und nichtcyclischen Photophosphorylierung sowie auch in der oxidativen Phosphorylierung involviert

sind, so daß sie für Vergleiche der ETS zur photosynthetischen und oxidativen Energiegewinnung besonders geeignet erscheinen (HORIO u. KAMEN, 1970).
Die Darstellung der Versuche zum Elektronentransport soll auf das Wesentliche beschränkt werden. Die erforderlichen methodischen Voraussetzungen wie die Ermittlung des Kationen- und Anioneneinflusses auf die Oxidaseaktivitäten oder die Optimierung der Spektralphotometrie zur in vivo-Bestimmung von Cytochromen in Anwesenheit von Bchl. und Carotinoiden werden nicht im einzelnen abgehandelt. Eine spätere Veröffentlichung ist geplant.

1. Herstellung von zellfreien Extrakten

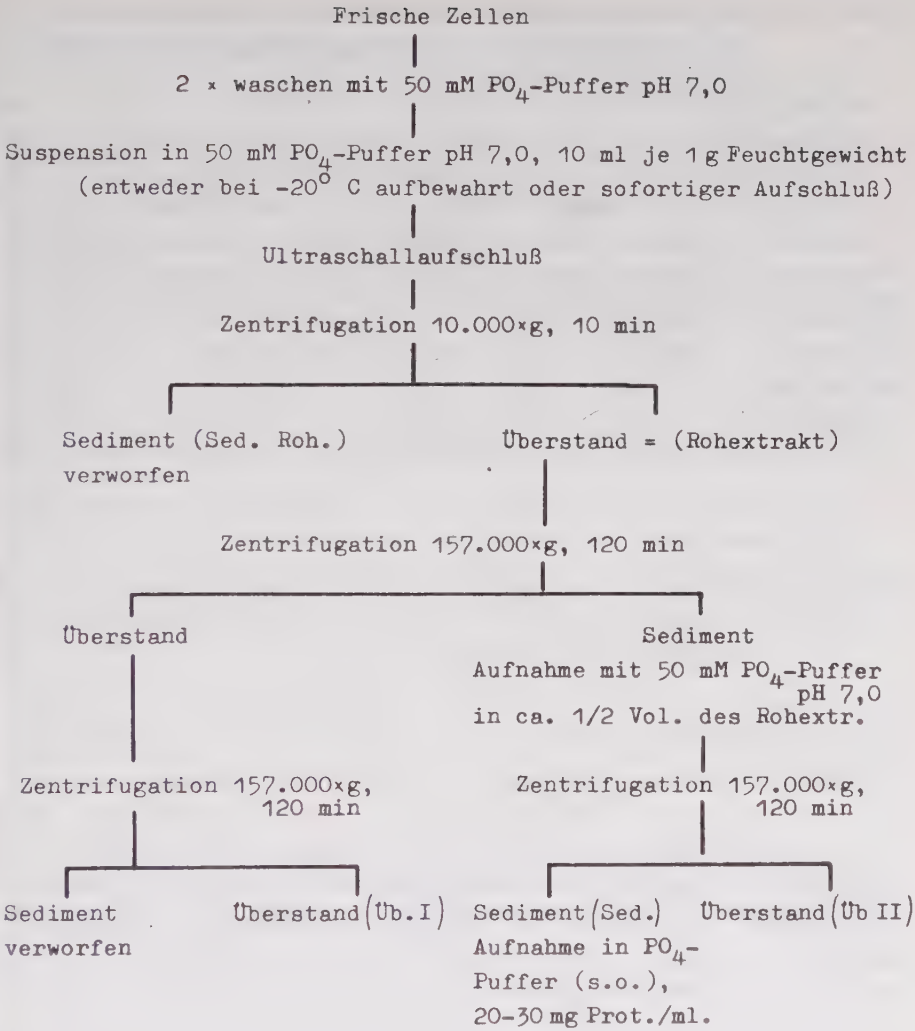
Untersuchungen der ETS sind nur im zellfreien System durchführbar. Die Präparation der Extrakte erfolgte bei den meisten der zitierten Autoren durch Zellaufschluß mit nachfolgender differentieller Zentrifugation, wodurch im wesentlichen zwei Fraktionen erhalten wurden: Eine bei 10.000 × g sedimentierende Membranfraktion, auch als partikuläre (PFITZNER, 1969) oder Chromatophoren-Fraktion (KLEMME u. SCHLEGEL, 1969) bezeichnet, und eine unterhalb von 100.000 × g nicht sedimentierende sogenannte lösliche oder partikelfreie Fraktion (PFITZNER, 1969). Bakterielle ETS mit Phosphorylierungsaktivität sind bisher nur in der Membranfraktion gefunden worden, obwohl die Phosphorylierung dort erst nach dem Zusatz der löslichen Fraktion oder entsprechender Faktoren zustande kam (ASANO u. BRODIE, 1964; BUTLIN et al., 1973; BENING u. EILERMANN, 1973). Eine weitere Differenzierung dieser Fraktionen durch Proteinfällung oder mit säulenchromatographischen Verfahren ermöglicht die Abtrennung einzelner Cytochrome, Cytochromoxidasen und anderer ETS-Komponenten. Mit keiner dieser Fraktionen konnte bisher eine Phosphorylierung erreicht werden.

Daraus ergibt sich, daß nur bei relativ schwach aufgetrennten Zellaufschlüssen eine Energiekonservierung möglich ist.

Aus diesem Grunde wurde in den vorliegenden Untersuchungen von einer über die fraktionierte Zentrifugation hinausgehenden Trennung von Zellbestandteilen abgesehen.

a. Aufschluß und fraktionierte Zentrifugation

Zunächst wurden folgende Zellaufschlußmethoden mit Rp. acidophila ausprobiert: Lysozym-Aufschluß, Aufschluß mit der X- und French-Presse und Ultraschallaufschluß. Verschiedene Inkubationszeiten mit Lysozym bei 30° C und 35° C nach Vorinkubation mit Äthylen-diamin-tetraessigsäure und Colistinsulfat ergaben keine Desintegration der Zellwände. Ein geringer Zellaufschlußgrad wurde mit der X-Presse nach mehrmaligem Durchdrücken des Kolbens erreicht. Mit der French-Presse wurde eine gute Zellaufschlußrate erzielt; die besten Ergebnisse lieferte jedoch der Ultraschallaufschluß. Die spezifischen Aktivitäten der NADH- und Succinat-Oxidase des Zellextraktes aus einem einmaligen Aufschluß mit der French-Presse waren um etwa 50% höher als im Ultraschallaufschluß. Ein zweimaliger Zellaufschluß mit der French-Presse mit einer dem Ultraschallaufschluß vergleichbaren Aufschlußrate ergab aber fast gleich hohe spezifische Enzymaktivitäten. Da der Aufschlußgrad sich aber mit der French-Presse weniger genau dosieren ließ, wurden die Zellen ausschließlich mit Ultraschall desintegriert. Die braunen Rhodospirillen haben im Vergleich zu Rp. acidophila sehr wenig widerstandsfähige Zellwände und konnten schon durch mehrmaliges Einfrieren aufgebrochen werden. Sie wurden aber wegen der Vergleichbarkeit der Methoden auch mit Ultraschall aufgebrochen. Bei Rp. acidophila führten Ultraschallaufschlüsse mit einer Beschallungszeit über 2,5 min je 20 ml Zellsuspension zu einer starken Abnahme der spez. Aktivität der NADH- und Succinat-Oxidase; dies traf auch für Beschallungszeiten von über 10 sec ohne dazwischengeschaltete Kühlintervalle zu (s. Seite 23). Für den Aufschluß von Zellen brauner Rhodospirillen wurde eine geringere Beschallungszeit benötigt als bei Rp. acidophila. Die zellfreien Extrakte der braunen Rhodospirillen hatten da-



Schema V 2: Darstellung des Ultraschallaufschlusses und der fraktionierten Zentrifugation

Tab. V 1: Fraktionierung eines Ultraschallaufschlusses von Rp. acidophila St. 7050 durch differentielle Zentrifugation (s. Schema V 2).

	Anzucht der Zellen					
	anaerob-Licht			aerob-Dunkel		
Fraktion	Bchl. (µg/ml)	Prot. (mg/ml)	Bchl./Prot. (µg/mg)	Bchl. (µg/ml)	Prot. (mg/ml)	Bchl./Prot. (µg/mg)
Rohextrakt	825,9	31,9	25,90	46,7	46,1	1,01
Sediment	690,8	17,3	39,90	74,6	31,4	2,37
Überstand I	0,45	7,6	0,06	0,6	12,2	0,05
Überstand II	1,7	2,9	0,57	0,15	2,5	0,06

Tab. V 2: Fraktionierung eines Ultraschallaufschlusses von R. molischianum St. N 131 durch differentielle Zentrifugation (s. Schema V 2)

	Anzucht der Zellen					
	anaerob-Licht			mikroaerob-Dunkel		
Fraktion	Bchl. (µg/ml)	Prot. (mg/ml)	Bchl./Prot. (µg/mg)	Bchl. (µg/ml)	Prot. (mg/ml)	Bchl./Prot. (µg/mg)
Rohextrakt	506,8	28,7	17,60	965,0	25,7	37,50
Sediment	344,0	13,4	25,70	723,5	16,4	44,10
Überstand I	1,5	21,1	0,07	6,1	5,7	1,07
Überstand II	0,4	1,7	0,23	2,9	3,5	0,83

her durchweg höhere spezifische Enzymaktivitäten als die Extrakte von Rp. acidophila.

Der Ultraschallaufschluß und die fraktionierte Zentrifugation ist in Schema V 2 dargestellt. Die erste Ultrazentrifugation bei 157.000 × g ergab ein festes Pellet und einen Überstand der bei phototroph kultivierten Zellen intensiv rot gefärbt war. Die Farbintensität des Überstandes war über dem sedimentierten Pellet am stärksten und nahm dann bis zum oberen Rand des Zentrifugenbechers ab. Der intensiv gefärbte Teil des Überstandes enthielt im Lichtmikroskop sichtbare Partikel. Um diese abzutrennen, wurde die zweite Ultrazentrifugation angeschlossen. Bei diesem Zentrifugengang sedimentierten diese Partikel, und der Überstand war gleichmäßig schwach rötlich gefärbt.

Tabelle V 1 und V 2 zeigen den Protein- und Bchl.-Gehalt der Fraktionen aus dem Ultraschallaufschluß. Der Überstand I (s. Schema V 2), der die lösliche Fraktion darstellt und im folgenden als Üb bezeichnet wird, hatte nur einen sehr geringen spez. Bchl.-Gehalt (Bchl./Prot.), was zeigt, daß er weitgehend frei war von intracytoplasmatischen Membranen. Das bei 157.000 g sedimentierte Pellet, welches die Membranfraktion darstellt und im folgenden als Sed. bezeichnet wird, hatte einen höheren spez. Bchl.-Gehalt als der Rohextrakt, so daß hier eine Anreicherung des photosynthetischen intracytoplasmatischen Membransystems stattgefunden hatte. Der spez. Bchl.-Gehalt des Üb II, welcher durch das Waschen der Sed.-Fraktion gewonnen wurde, enthielt einen etwas höheren spez. Bchl.-Gehalt, da er nur eine Ultrazentrifugation durchlief. Er wurde nur in besonderen Fällen für enzymatische Versuche verwendet.

b. Elektronenmikroskopische Untersuchungen

Elektronenoptische Aufnahmen der Ultraschallextrakte von Rp. acidophila, R. fulvum und R. molischianum zeigten vesikuläre Strukturen nur in der Sed.-Fraktion; sie waren von einer Membran, deren Dicke mit 55 - 80 Å bestimmt wurde, umgeben. An der Oberfläche befanden sich bei beiden Zellarten ringförmige Strukturen (s. Abb. V 1). Die vesikulären Strukturen hatten bei Rp. acidophila einen geringeren Durchmesser, weil hier durch die längere Ultraschallbehandlung kleinere Membranfragmente entstanden waren, welche dann zur Bildung dieser Vesikeln geführt hatten.
Die Üb I-Fraktion enthielt außer den ringförmigen Strukturen noch Membranpartikel, die sich wegen ihres geringen Durchmessers (200 - 250 Å) nicht zu vesikulären Körpern schließen konnten.

Die Ringstrukturen sind vermutlich im nativen Zustand membrangebunden und werden durch die Zellfraktionierung abgetrennt, was dadurch bestätigt wird, daß sie auch im Waschpuffer (Üb II) der Sed.-Fraktion gefunden wurden. Sie stellen höchstwahrscheinlich Enzymkomplexe dar, wie sie in ähnlicher Form z. B. von BEUSCHER, MAYER u. GOTTSCHALK (1974) gefunden wurden.
Da sich diese Enzymkomplexe auf vesikulären Membranpartikeln befinden und nur in dieser Partikelfraktion die beiden enzymatischen Oxidations-Reduktions-Enzymkomplexe des Elektronentransportes, die NADH- und die Succinat-Oxidase, gemeinsam vorkommen und auch nur in dieser Zellfraktion eine in vitro Phosphorylierung gefunden wurde (YAMASHITA et al., 1967), können diese ringförmigen Strukturen in Zusammenhang mit der Phosphorylierung gebracht werden.

ASANO et al. (1973) fanden bei Mycobacterium phlei in Membranvesikeln, die durch Ultraschallbehandlung gewonnen wurden, daß sich bei diesen die ursprüngliche Innenseite der Membran jetzt außen befand. Es gelang ihnen, Membranvesikeln ohne Verwendung von Ultraschall herzustellen, deren

Außenseite die ursprüngliche Außenseite der Membran darstellte.

In den ultraschallbehandelten Membranpartikeln von Mycobacterium phlei konnten HIGASI et al. (1969) vier lösliche Kopplungsfakten zur in vitro Phosphorylierung (bacterial coupling factors, BCF) in Abwesenheit von Mg^{++} im Sucrosegradienten als leichte Fraktionen abtrennen. In der von den BCF befreiten schweren Membranfraktion konnte keine Phosphorylierung mehr nachgewiesen werden. Erst nach einer Zugabe der leichten Fraktionen BCF_1 bis BCF_4 kam wieder eine Phosphorylierung zustande.

Gleiche Ergebnisse erzielten ASANO et al. (1973), aber im Unterschied dazu konnten sie bei den Membranvesikeln mit der Membranaußenseite an der Oberfläche keine Abtrennung des BCF_4, von diesen Autoren "factor latent ATPase" (latente ATPase) genannt, erreichen. In den ultraschallbehandelten Membranvesikeln mit abgelöster latenter ATPase fanden sie durch erneutes Hinzufügen von ATPase und NADH etwa 54% der ursprünglichen Phosphorylierungsaktivität wieder.

In den hier mit Ultraschall gewonnenen Vesikeln sollte sich daher auch die "innere" Membranseite auf der Oberfläche befinden, und da die Herstellung der Partikel (s. Tab. V 2) in Abwesenheit von Mg^{++} erfolgte, könnten die abgelösten ringförmigen Strukturen der latenten ATPase entsprechen. Die in Abb. V 1 dargestellten ringförmigen Strukturen (durch große Kreise hervorgehoben) auf einer Vesikel könnten demnach die native ATPase darstellen. Vergleichbare Ringstrukturen wurden an Thylakoidmembranen von Spinat-Chloroplasten gefunden und von HOWELL u. MOUDRIANAKIS (1967); MURAKAMI (1968) und OLESZKO u. MOUDRIANAKIS (1974) als coupling factor der Photophosphorylierung identifiziert.
Interessant ist weiter, daß sich in den zellfreien Extrakten von Rp. acidophila zwei Arten von ringförmigen Strukturen mit unterschiedlichem Durchmesser befanden, während die beiden braunen Rhodospirillen nur eine Art aufwiesen (Tab. V 3).

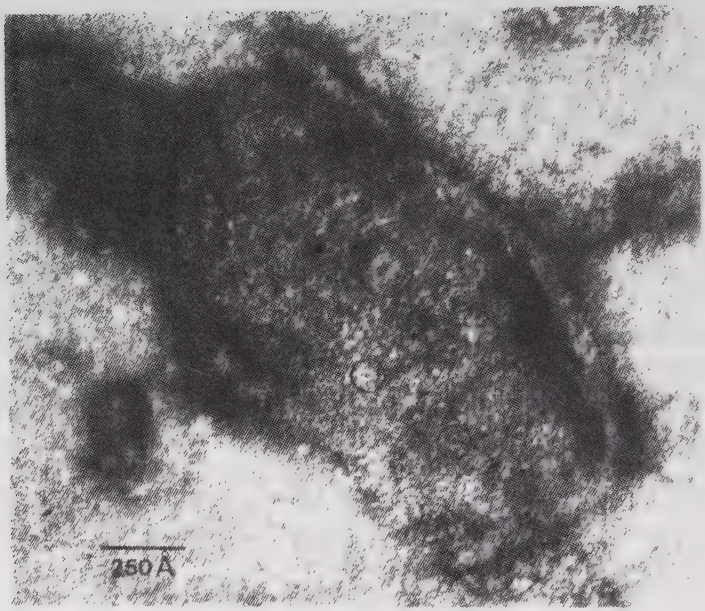


Abb. V 1: Elektronenmikroskopische Aufnahme eines vesikulären Körpers mit ringförmigen Strukturen (s. Text) aus der Sed.-Fraktion eines Ultraschallaufschlusses aerob im Dunkeln kultivierter Zellen von Rp. acidophila

Negativ-Kontrastierung (VALENTINE et al., 1968) mit Uranylacetat pH 4,8. Sämtliche elektronenoptischen Untersuchungen wurden von F. MAYER mit einem Philips EM 301 Elektronenmikroskop durchgeführt.

Tab. V 3: Zusammenfassende Darstellung der elektronenmikroskopischen Untersuchung der Ultraschallaufschlüsse von anaerob im Licht und aerob im Dunkeln kultivierten Zellen von Rp. acidophila, R. fulvum und R. molischianum

		vesikuläre Körper (1)	ringförmige Strukturen an (1)	abgelöste ringförmige Strukturen
Rp. acidophila	Sed.	500-850 Å	90 u. 150 Å	90 u. 150 Å
	Üb	-	-	90 u. 150 Å
R. fulvum	Sed.	850-1000 Å	120 Å**	120 Å
	Üb.	-	-	120 Å
R. molischianum	Sed.	*	120 Å**	120 Å
	Üb	-	-	120 Å

Elektronenmikroskopische Präparationstechnik: Negativkontrastierung (VALENTINE et al., 1968) mit Uranylacetat pH 4,8.

— = konnte nicht nachgewiesen werden

* = nicht gemessen

** = nur in sehr geringer Zahl vorhanden

Nimmt man an, daß die 150 Å großen ringförmigen Strukturen von Rp. acidophila die ATPase darstellen (F. MAYER, unveröffentlicht), so müßte das Energiegewinnungssystem von Rp. acidophila anders aufgebaut sein als das der braunen Rhodospirillen, da deren ringförmige Strukturen nur einen Durchmesser von 120 Å haben.

Sieht man von dem möglichen Zusammenhang zwischen Energiegewinnung und ringförmigen Strukturen ab, so ist dennoch bemerkenswert, daß die beiden braunen Rhodospirillen einen gleichförmigen Typ besitzen, während in Rp. acidophila zwei Typen vorkommen, die sich jedoch beide in ihrer Größe von dem Typ der braunen Rhodospirillen unterscheiden.

c. Lokalisation der Enzymaktivitäten in den Zell-Fraktionen

Es wurden folgende ETS-Enzyme untersucht: NADH-Oxidase, Succinat-Oxidase, Cytochrom c-Oxidase und NADH-Cytochrom c-Reduktase. Diese wurden an Rp. acidophila und den braunen Rhodospirillen R. fulvum und R. molischianum unter den zwei Wachstunsbedingungen anaerob-Licht und aerob bzw. mikroaerob-Dunkel untersucht, bei R. photometricum nur die Enzyme der anaerob im Licht kultivierten Zellen.
Die Untersuchungsergebnisse der drei braunen Rhodospirillen waren weitgehend gleichartig, so daß hier im wesentlichen die Ergebnisse von R. fulvum dargestellt und denen von Rp. acidophila gegenübergestellt werden.

Auch von den untersuchten Enzymen wurden nur die beiden Enzymsysteme NADH-Oxidase und Succinat-Oxidase im Detail dargestellt, da globale Änderungen im ETS infolge der unterschiedlichen Wachstumsbedingungen besser mit dem gesamten Enzymsystem erfaßt werden als mit einzelnen Enzymen (TANIGUCHI u. KAMEN, 1965; YAMASHITA et al., 1967; THORE et al., 1969).

Einen Überblick über die Gesamtausbeute der NADH- und Succinat-

Oxidase und deren Verteilung auf die Fraktionen aus den mit Ultraschall ausgeschlossenen Zellen geben Tabelle V 4 und V 5. Daraus wird deutlich erkennbar, daß die Succinat-Oxidase nur in der Membranfraktion vorkommt, während die NADH-Oxidase auch in der löslichen Üb I und Üb II-Fraktion vorhanden ist. Gleiche Ergebnisse erzielten auch TANIGUCHI u. KAMEN (1964) und THORE et al. (1969) mit R. rubrum sowie KLEMME u. SCHLEGEL (1969) mit Rp. capsulata. Vergleicht man die Ausbeute der NADH-Oxidase-Aktivität bei R. fulvum mit der von Rp. acidophila, so fällt auf, daß bei R. fulvum fast 95% der Ausgangsaktivität wieder in der Sed.-Fraktion gefunden wird, bei Rp. acidophila dagegen nur die Hälfte; in den Zellen aus Wachstum aerob im Dunkeln verringerte sich der Anteil der Aktivität im Sediment auf ein Fünftel. Der Unterschied zwischen den beiden Arten ist durch den längeren Ultraschallaufschluß bei Rp. acidophila bedingt. Der Unterschied zwischen phototrophen und aeroben Zellen von Rp. acidophila ist durch den qualitativ verschiedenen Membrangehalt beider Zellarten bedingt.

Die Bi dung der Enzyme an die Cytoplasmamembran in den aeroben Zellen bedingt sicherlich beim Ultraschallaufschluß eine leichtere Ablösbarkeit, als sie durch die Bindung an das intracytoplasmatische Membransystem gegeben wäre, was auch dadurch deutlich wird, daß sich der Anteil der NADH-Oxidase in der Üb I und Üb II-Fraktion aerober Zellen gegenüber den phototrophen Zellen erhöht. Die Gesamtausbeute ist in beiden Zellarten gleich hoch. Ähnliche Ergebnisse erzielten THORE et al. (1969) bei R. rubrum.

Ähnlich liegen die Verhältnisse bei der Succinat-Oxidase. Die Aktivitätsausbeute in den phototrophen Zellen von Rp. acidophila ist mit der der phototroph und mikroaerob gewachsenen Zellen von R. fulvum vergleichbar, aber die Ausbeute in den aeroben Zellen von Rp. acidophila vermindert sich, und da die Succinat-Oxidase nur membrangebunden aktiv ist, kann der vermutlich abgelöste und in der Üb-Fraktion befindliche Teil dort

Tab. V 4: Verteilung der Gesamtaktivität der NADH- und Succinat-Oxidase auf die Fraktionen eines Ultraschallextraktes von Zellen aus Rp. acidophila.

	NADH-Oxidase			
Anzucht der Zellen	anaerob-Licht		aerob-Dunkel	
Fraktion	Gesamtaktivität (EE)	Ausbeute (%)	Gesamtaktivität (EE)	Ausbeute (%)
Rohextrakt	16891	100	6734	100
Sediment	7742	46	1332	20
Überstand I	2415	14	2574	38
Überstand II	334	2	413	6

	Succinat-Oxidase			
Anzucht der Zellen	anaerob-Licht		aerob-Dunkel	
Fraktion	Gesamtaktivität (EE)	Ausbeute (%)	Gesamtaktivität (EE)	Ausbeute (%)
Rohextrakt	6160	100	6988	100
Sediment	5056	82	2971	43
Überstand I	0	0	172	3
Überstand II	0	0	0	0

Zur Fraktionierung des Ultraschallextraktes s. Schema V 2.
Bestimmung der Enzymaktivitäten mit der polarographischen Methode, s. Kap. II G od. Tab. V 6.

EE = Enzymeinheiten, 1 EE = 1 nmol $O_2 \cdot min^{-1} \cdot mg\ Prot^{-1}$

Tab. V 5: Verteilung der Gesamtaktivität der NADH- und Succinat-Oxidase in einem fraktionierten Ultraschallextrakt aus Zellen von R. fulvum

	NADH-Oxidase			
Anzucht der Zellen	anaerob-Licht		mikroaerob-Dunkel	
Fraktion	Gesamtaktivität (EE)	Ausbeute (%)	Gesamtaktivität (EE)	Ausbeute (%)
Rohextrakt	29568	100	67431	100
Sediment	28089	95	63705	94
Überstand I	1478	5	1428	2

	Succinat-Oxidase			
Anzucht der Zellen	anaerob-Licht		mikroaerob-Dunkel	
Fraktion	Gesamtaktivität (EE)	Ausbeute (%)	Gesamtaktivität (EE)	Ausbeute (%)
Rohextrakt	29106	100	47649	100
Sediment	22800	78	34118	72
Überstand I	0	0	137	0,3
Überstand II	0	0	0	0

Zur Fraktionierung des Ultraschallextraktes s. Schema V 2.
Bestimmung der Enzymaktivitäten mit der polarographischen Methode; s. Kap. G od. Tab. V 6.

EE = Enzymeinheiten, 1 EE = 1 nmol $O_2 \cdot min^{-1} \cdot mg\ Prot^{-1}$

nicht nachgewiesen werden. (Eine Zugabe des Üb zum Sed. ergab keine Aktivitätserhöhung der Succinat-Oxidase).

Die folgende Verteilung der Ausbeuten der Cyt.c-Oxidase und NADH-Cyt.c-Reduktase-Aktivität in den Fraktionen ist ähnlich wie die der NADH- und Succinat-Oxidase:

Cyt.c-Oxidase in R. fulvum, mae-D

Fraktion	Aktivität nmole $O_2 \cdot min^{-1} \cdot mg\ Prot.^{-1}$	Ausbeute EE	%
Rohextrakt	3,5	9800	100
Sed.	6,6	8238	84
Üb I	0,0	0	0

NADH-Cyt.c.-Reduktase in Rp. acidophila, ae-D

	nmole Cyt.c $\cdot min^{-1} \cdot$ mg Prot.$^{-1}$	EE.	%
Rohextrakt	169	340 197	100
Sed.	0	0	0
Üb I	451	195 734	57
Üb II	261	42 804	13

Die Cytochrom c-Oxidase ist membrangebunden, was sich darin zeigt, daß die Aktivität nur in der Sed.-Fraktion gefunden wurde. Die Enzymausbeute entspricht etwa der der Succinat-Oxidase. Dagegen konnte die NADH-Cytochrom c-Reduktase, welche einen Maßstab für die NADH-Dehydrogenase-Aktivität darstellt, in phototroph wie in chemotroph gewachsenen Zellen nur abgelöst von den Membranvesikeln im Rohextrakt und den daraus gewonnenen Üb I und Üb II, nachgewiesen werden. Eine gleichartige Verteilung dieser beiden Enzyme in aerob gewachsenen R. rubrum fanden auch TANIGUCHI u. KAMEN (1964).
Obwohl der Anteil der NADH-Cyt.c-Reduktase üm Üb I und Üb II höher ist als bei der NADH-Oxidase (unter vergleichbaren Bedingungen), dürfte sie dennoch einen Teil der "löslichen" NADH-Oxidase darstellen. Allerdings sollte dann ein anderes Enzym im NADH-Oxidase-System für die Reaktionsgeschwindigkeit bestim-

mend sein; dieses Enzym dürfte zwischen dem Cyt.c und dem Endakzeptor lokalisiert sein und sollte somit dem Endoxidase-Typ zugerechnet werden können.

Die hier dargestellten Befunde zeigen, daß die untersuchten Enzyme des ETS bei phototroph und chemotroph angezogenen Zellen von R. fulvum in gleicher Weise verteilt sind, während sie bei den zwei Zellarten von Rp. acidophila unterschiedlich verteilt sind, was darauf schließen läßt, daß in der Cytoplasmamembran der aeroben Zellen eine andere Bindungsart vorliegt als in den intracytoplasmatischen Membranen (OELZE u. DREWS, 1972). Die Abtrennung der Cyt.c-Oxidase von den Membranvesikeln des Sed. aerober Zellen von Rp. acidophila führte vermutlich zur Verminderung der Succinat-Oxidase-Ausbeute und könnte somit den leichter ablösbaren Faktor der Succinat-Oxidase darstellen.

2. Aktivität von Enzymen der Elektronentransportkette in Abhängigkeit von den Wachstumsbedingungen

Der Einfluß der phototrophen und aeroben Wachstumsbedingungen auf die Verteilung der spezifischen Aktivitäten der NADH- und Succinat-Oxidase ist aus Tabelle V 6 ersichtlich. Die Verteilung NADH-Cyt.c-Reduktase und der NADH-Oxidase-Aktivität wurde bereits im vorangegangenen Abschnitt dargestellt.
Die Enzymaktivitäten der einzelnen Enzyme des Elektronentransports schwankten sehr stark von einer Fermenteranzucht zur anderen, und zwar sowohl bei Wachstumsbedingungen anaerob im Licht als auch aerob im Dunkeln. Eine nähere Untersuchung dieses Phänomens ergab, daß Zellen mit ähnlichem spez. Bchl.-Gehalt auch vergleichbare Enzymaktivitäten hatten. Da der spez. Bchl.-Gehalt innerhalb bestimmter Grenzen einen Maßstab für die Ausdehnung des intracytoplasmatischen Membransystems darstellen kann (OELZE u. DREWS, 1972; DREWS, 1972), ist ein Zusammenhang zwischen dem Gehalt an intracytoplasmatischen Mem-

branen und spezifischer Aktivität der Enzyme des ETS sehr wahrscheinlich. Der spez. Bchl.-Gehalt wird, wie in Kap. IV D dargestellt, jeweils durch die effektive Beleuchtungsstärke und den pO_2 reguliert, die damit gewissermaßen auch die spez. Aktivität dieser Enzyme bestimmen. Die relativ hohen Schwankungen der Enzymaktivitäten, von denen KLEMME u. SCHLEGEL (1969) berichten, könnten ebenfalls auf Verwendung von Zellmaterial mit unterschiedlichem Bchl.-Gehalt zurückzuführen sein. Wegen der Schwankungen sind in den Tab. V 6 und V 7 die spezifischen Enzymaktivitäten als Mittelwerte verschiedener Zellanzuchten dargestellt. Dabei ist zu berücksichtigen, daß bei Rp. acidophila die Werte aus 10 Fermenteranzuchten in die Berechnung des Mittelwertes eingingen, bei den braunen Rhodospirillen dagegen nur vier, die zudem relativ hohe Abweichungen vom Mittelwert zeigten. Zur Charakterisierung der Enzyme in Abschnitt 3 wurden Zellen mit etwa gleich hohem spez. Bchl.-Gehaltes verwendet.

Die Zunahme der spezifischen Aktivität der NADH-Cyt.c-Reduktase (Abschnitt 2 c) im Üb I im Vergleich zum Rohextrakt ist sicherlich darauf zurückzuführen, daß das Enzym nur in den nicht vesikulären Membranpartikeln des Üb I aktiv ist. Ein Beweis dafür ist darin zu sehen, daß die Üb II-Fraktion eine vergleichsweise hohe spezifische Aktivität enthält, wohingegen in der Sed.-Fraktion, aus der sie stammte (Waschpuffer!), keine Aktivität vorhanden war. Umgekehrt verhält es sich bei der Cytochrom c-Oxidase, die nur in Verbindung mit den vesikulären Membranstrukturen der Sed.-Fraktion aktiv war, was daraus hervorgeht, daß der Rohextrakt, welcher auch nicht vesikuläres Membran-Protein enthielt, eine geringere spezifische Aktivität hatte. Eine Hemmung durch die Üb-Fraktion wurde nicht gefunden.

Die NADH-Oxidase von R. fulvum zeigte im Unterschied zu R. molischianum im Sediment eine bedeutend höhere spezifische Aktivität als im Überstand. Die relativ feste Bindung des Enzyms an die Membranen steht möglicherweise im Zusammenhang mit der Sauerstoffunempfindlichkeit von R. fulvum bei phototrophem

Tab. V 6: Lokalisation der spez. Aktivitäten der NADH- und Succinat-Oxidase in den Fraktionen von Ultraschallextrakten aus Zellen von Rp. acidophila, R. fulvum und R. molischianum.

	Anzucht der Zellen	spez. Aktivität der "Oxidasen" in nmole $O_2 \cdot min^{-1} \cdot mg\ Prot^{-1}$. NADH-Oxidase Sed.	Üb I	Succinat-Oxidase Sed.	Üb I
Rp. acidophila	an-L	5,34	5,97	2,72	0,0
	ae-D	8,50	12,63	4,94	0,0
R. fulvum	an-L	18,09	4,9	19,18	0,0
	mae-D	22,50	2,9	20,47	0,0
R. molischianum	an-L	6,67	4,64	13,14	0,0
	mae-D	6,47	5,79	17,46	0,0

Die Anzucht der Zellen erfolgte im Fermenter unter Standardbedingungen (Kap. II 3); aerob bzw. mikroaerob im Dunkeln erfolgte sie etwa im pO_2-Optimum (Kap. IV D 2).
Die Enzymaktivitäten wurden mit der polarographischen Methode gemessen (Kap. II G). Die Zahlenwerte sind Mittelwerte ($\bar{x}$) von Zellaufschlüssen aus 10 verschiedenen Anzuchten bei Rp. acidophila und 4 Anzuchten bei R. fulvum und R. molischianum.

an-L = anaerob-Licht
ae-D = aerob-Dunkel
mae-D = mikroaerob-Dunkel

Tab. V 7: Aktivität von ETS-Enzymen in Abhängigkeit von den Wachstumsbedingungen

		spezifische Aktivität					
		Rp.acidophila		R.fulvum		R.molischianum	
Wachstumsbedingungen		an-L	ae-D	an-L	mae-D	an-L	mae-D
NADH-Oxidase	(1)	13,4	23,1	8,2	7,0	11,9	6,9
NADH-Oxidase	(2)	4,2	8,5	18,2	22,0	6,6	6,5
Succinat-Oxidase	(2)	2,7	4,9	19,2	20,5	13,8	17,5
Cyt.c-Oxidase	(2)	2,8	16,4	9,5	9,0	8,6	21,8
NADH-Cyt.c-Oxidase	(3)	20,0	32,6	7,1	7,3	10,5	13,1

Die Anzucht der Zellen erfolgte im Fermenter unter Standardbedingungen (Kap. II 3); aerob bzw. mikroaerob im Dunkeln erfolgte sie etwa im pO_2-Optimum (Kap. IV D 2); an-L = anaerob-Licht, ae-D = aerob-Dunkel, mae-D = mikroaerob-Dunkel.
Die Zahlenwerte sind Mittelwerte ($\bar{x}$) der höchsten Aktivitäten von Zellaufschlüssen aus verschiedenen Anzuchten. Bei polarographischen Bestimmungen abzüglich endogener Atmung.
(1) nmole NADH/min · mg Prot (photometrische Bestimmung)
(2) nmole O_2/min · mg Prot (polarographische Bestimmung)
(3) nmole Cyt.c/min · mg Prot (photometrische Bestimmung)

Reaktionsgemische für photometrische Bestimmungen:
NADH-Oxidase: 0,1-0,2 ml lösliche Fraktion (Üb I) mit ca. 1,0 mg Prot.; 75 mM PO_4-Puffer; 0,2 mM NADH; aqua dest ad 1,0 ml; 25°C.

NADH-Cytoch.c-Reduktase; 0,05-0,1 ml lösl. Fraktion (Üb I) mit ca. 0,5-1,0 mg Prot.; 150 mM PO_4-Puffer; 20 mM KCl; 0,1 mM Cytochr.c; 0,4 mM NADH; aqua dest. ad 1 ml; Atmosphäre 100% N_2; 25° C, pH 7,0.

Reaktionsgemische für polarographische Bestimmungen; NADH-Succinat-Oxidase: 0,1 ml Membranfraktion (Sed) mit ca. 1 - 2 mg Prot.; 50 mM PO_4-Puffer; 3,3 mM NADH bzw. 10 mM Succinat; aqua dest. ad 3,0 ml; 30° C.

Cyt.c-Oxidase: 0,1 ml Membranfraktion (Sed.) mit ca. 1,0 mg Prot.; 50 mM PO_4-Puffer; 8,3 mM $MgCl_2$; 10 mM Ascorbat pH 7,0; 0,166 mM Cytochrom c; aqua dest. ad 3,0 ml; 30° C, pH 7,0.
pH-Werte, falls nicht angegeben, entsprechend dem pH-Optimum.

Wachstum. Daß die Aktivität der NADH-Oxidase im Üb I von aerob gewachsenen Rp. acidophila höher ist als in den phototrophen Zellen, kann durch die bereits besprochene stärkere Abtrennung des Enzymsystems von der Cytoplasmamembran erklärt werden. Vergleicht man die höchsten durchschnittlichen spezifischen Aktivitäten aller gemessenen Enzyme (Tab. V 7), so ergibt sich für aerob kultivierte Zellen von Rp. acidophila ein um den Faktor 2 bis 4 höherer Wert als für anaerob im Licht gewachsene Zellen, wohingegen die Aktivitäten bei R. fulvum nahezu gleich waren. Bei R. molischianum lagen die Aktivitäten der mikroaeroben Zellen nur um den Faktor 1,2 (Cyt.c-Oxidase 2,5) höher als in phototrophen Zellen. Die höhere Enzymaktivität in den aeroben Zellen von Rp.acidophila steht im Einklang mit Befunden an R. rubrum von THORE et al., 1969, die eine Zunahme der NADH- und Succinat-Oxidase-Aktivität um den Faktor 4,0 bis 4,3 feststellten; sie konnten nachweisen, daß sich die gesamte NADH- und Succinat-Oxidase-Aktivität,bezogen auf das pro Zelle enthaltene Protein, nicht änderte. Dies ist auch bei Rp. acidophila anzunehmen, so daß die Vermutung naheliegt, daß die Erhöhung der Enzymaktivitäten bei aerobem Wachstum mit der Verkleinerung des Membransystems einhergeht (siehe Diskussion).

3. Charakterisierung von Enzymen der Elektronentransportkette

a. Rp. acidophila

α. NADH-Oxidase

Eine Prüfung der NADH-Oxidase in der Sed.- und Üb I-Fraktion zeigte, daß sich die Aktivitäten durch Aufbewahrung bei verschiedenen Temperaturen,durch Änderung des pH-Wertes und nach Zusatz von KCN in gleicher Weise veränderten. Eine Zugabe des Üb I zum Sed. bewirkte nur eine Addition beider Aktivitäten. Diese Befunde lassen darauf schließen, daß es sich in beiden Fraktionen um das gleiche Enzymsystem handelt. Da eine Aktivitätsbestimmung im optischen Versuch einfacher durchzuführen war

und diese Methode bessere Meßwerte ergab als die polarographische Bestimmung, wurde die Charakterisierung der NADH-Oxidase mit der Üb I-Fraktion durchgeführt.

pH-Optimum und Stabilität

Die höchste Aktivität in der Üb I-Fraktion phototroph angezogener Zellen von Rp. acidophila wurde mit Phosphat-Puffer bei einem pH-Wert von pH = 5,5 gemessen (Abbildung V 2); in Citrat-Puffer bei pH = 5,0 war die Aktivität etwas geringer. Im Sed. wurde die höchste Aktivität in Citrat-Puffer pH 5,0 erreicht. Die niedrigere Aktivität mit Phosphat-Puffer bei pH 5,5 kann durch die ungenügende Puffer-Wirkung des Phosphat-Puffers in diesem pH-Bereich erklärt werden, die sich hier besonders in der Membranfraktion bemerkbar machte.

In Extrakten aus aerob im Dunkeln gewachsenen Zellen erreichte die spezifische Aktivität der NADH-Oxidase die höchste Aktivität in Phosphat-Puffer bei pH = 8,0 (Abbildung V 3), etwas geringer war sie in Borat-Puffer bei pH = 9,0.

Die unterschiedlichen pH-Optima der NADH-Oxidase im zellfreien Extrakt phototroph und chemotroph gewachsener Zellen finden eine Erklärung in der Cytochromanalyse: Aerobe Zellen hatten vorwiegend die Endoxidasen Cyt.$c_{558(CO)}$ und Cyt.$b_{562(CO)}$, phototrophe Zellen dagegen nur Cyt.$c_{550(CO)}$. Keinen Einfluß auf die Stabilität der NADH-Oxidase hatten Zusätze von NADH, $FeSO_4$, KCl, $MgCl_2$, $MnSO_4$ und NaCl; die Stabilität war in Phosphatpuffer bei pH 7,0 - 7,5 am höchsten, desgleichen waren Temperaturen von 2 - 4°C und eine Aufbewahrung unter Sauerstoffabschluß am günstigsten. Unter Stickstoffatmosphäre bei -2°C und in Phosphatpuffer pH 7,0 verringerte sich die Aktivität in den ersten 24 h nach Herstellung der Extrakte um 50%, danach nahm sie pro 24 h um jeweils 30% ab.

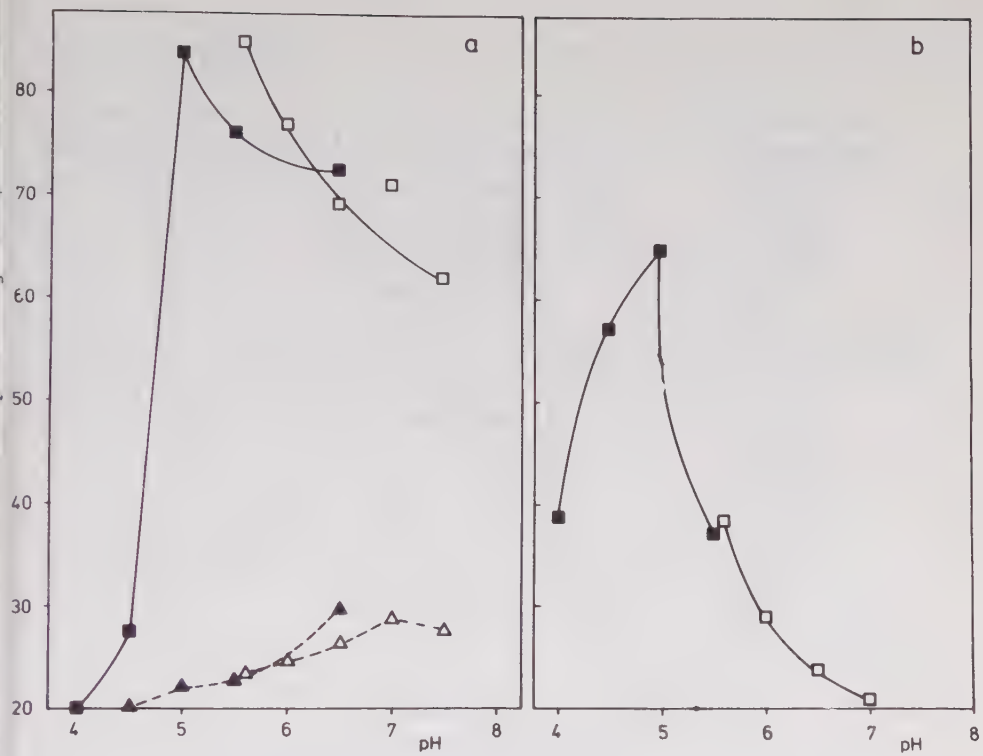


Abb. V 2: Abhängigkeit der NADH-Oxidase-Aktivität von der Wasserstoffionenkonzentration in der Üb I und Sed.-Fraktion aus anaerob im Licht gewachsenen Zellen von Rp. acidophila.

Aktivitätsbestimmung in der Üb I-Fraktion (a) spektralphotometrisch und in der Sed.-Fraktion (b) polarographisch.

a) Reaktionsansatz bei photometrischer Aktivitätsbestimmung: Puffer nach Angabe 100 mM; 25°C; NADH 0,2 mM; Üb I mit 0,75 mg Prot.; aqua dest. ad 1,0 ml. Reaktionsbeginn durch Zugabe des NADH.

▲ - ■ - = Citrat-Puffer Δ - □ - = pO_4-Puffer

b) Reaktionsansatz wie in Abb. V 3, davon abweichend Sed. mit 3,8 mg Prot. und 50 mM Puffer.

-■-□- = Aktivitätsbestimmung im Zeitabschnitt bis zu 1 min nach Reaktionsbeginn

--▲--Δ-- = Aktivitätsbestimmung im Zeitabschnitt von 1 bis 2 min nach Reaktionsbeginn (s. Abschn. 3 c)

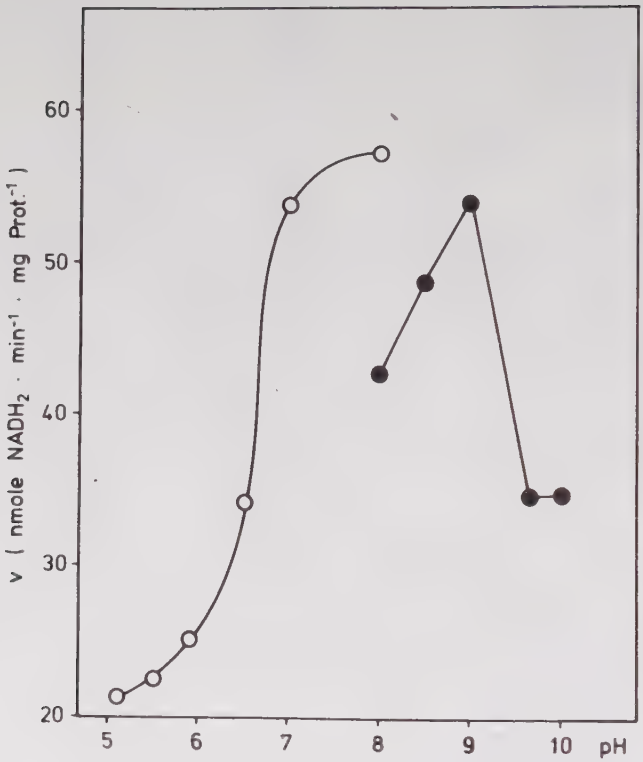


Abb. V 3: Abhängigkeit der NADH-Oxidase-Aktivität von der Wasserstoffionenkonzentration in der Üb I-Fraktion aus aerob im Dunkeln gewachsenen Zellen von Rp. acidophila.

Aktivitätsbestimmung polarographisch.
Reaktionsansatz: Angegebener Puffer 75 mM; 30°C; NADH 4 mM; Üb I mit 1,7 mg Prot.; aqua dest. ad 2,0 ml.
Reaktionsbeginn mit NADH.

-○- = PO_4-Puffer -●- = Borat-Puffer

Temperaturoptimum

Zur Ermittlung der Temperaturabhängigkeit der Reaktionsrate wurden die Aktivitäten bei Temperaturen von 10 - 50°C bestimmt. Die maximale Reaktionsgeschwindigkeit wurde im Üb I phototropher Zellen bei 45°C, im Üb I aerober Zellen bei 40°C gefunden; höhere Temperaturen bewirkten einen steilen Aktivitätsabfall (Abbildung V 4a).

Die Aktivierungsenergie die für die Übertragung der Reduktionsäquivalente vom NADH auf den Sauerstoff aufgebracht werden muß, soll durch die Arrhenius-Gleichung

$$E_A = 2{,}303\ RT^2\ \frac{d \log k}{dT}$$

bestimmt werden, daraus folgt

$$E_A = 2{,}303\ R\ T_1\ T_2\ \frac{\log k^1 - \log k^2}{(T_2 - T_1)}$$

E_A = Arrhenius Aktivierungsenergie
k = Geschwindigkeitskonstante der Reaktion
R = allgemeine Gaskonstante (1,98 cal · $grad^{-1}$ · Mol^{-1})
T = absolute Temperatur (°K)
$k^{1(2)}$ = Reaktionsgeschwindigkeiten bei den Temperaturen von T_1 und T_2

Da unter Verduchsbedingungen k proportional v_{max} ist (MAHLER u. CORDES, 1969), ist

$$\frac{E_A}{-\ 2{,}303\ R} \cdot = \frac{E_A}{4{,}56}$$

der Steigung in der graphischen Auftragung von log k gegen 1/T direkt proportional.

Zur Berechnung der Aktivierungsenthalpie (ΔH) müssen die E_A-Werte nach der "Theorie der absoluten Reaktionsrate" von EYRING sowie nach der kinetischen Gastheorie (ULICH-JOST, 1970; DIXON u. WEBB, 1964) noch korrigiert werden: $\Delta H = E_A - mRT$, wobei m von der Anzahl der Reaktionspartner und dem Re-

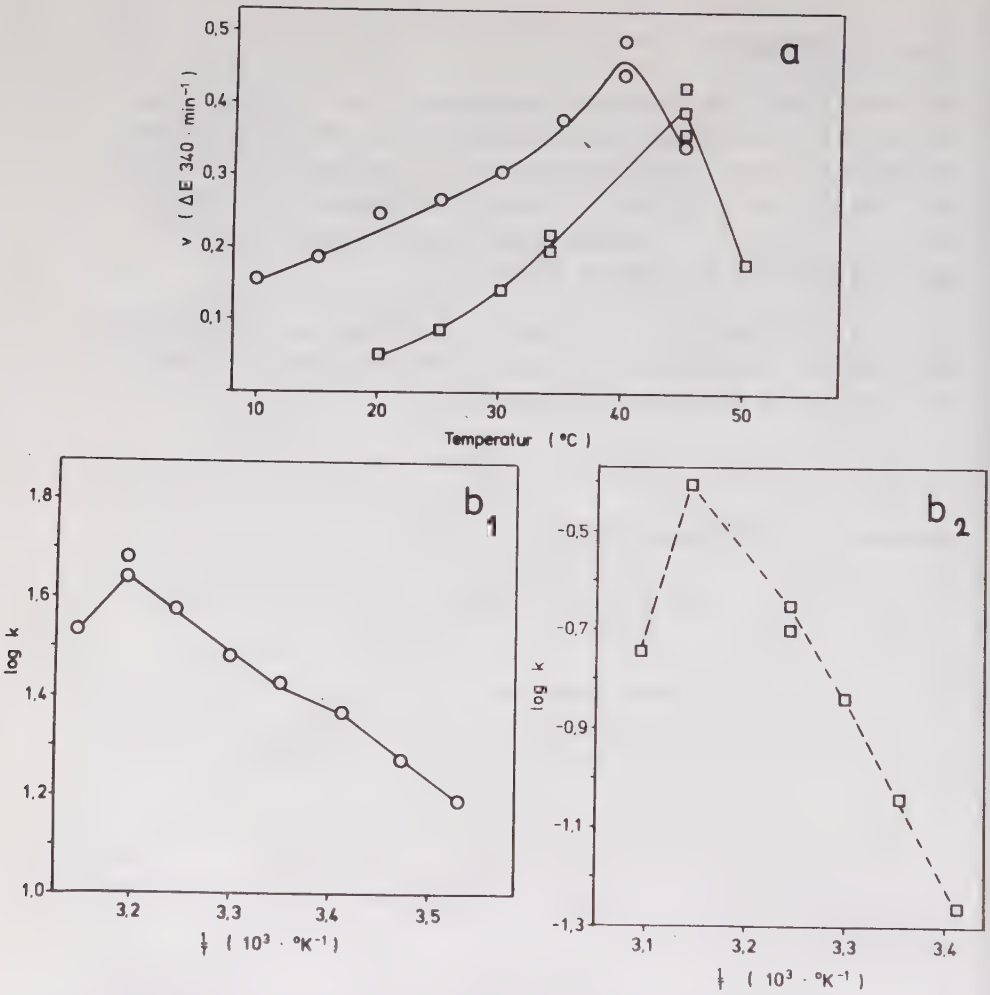


Abb. V 4a: Abhängigkeit der NADH-Oxidase-Aktivität von der Inkubationstemperatur in der Üb I-Fraktion aus anaerob im Licht und aerob im Dunkeln gewachsenen Zellen von Rp. acidophila.

Reaktionsansatz wie in Abb. V 7, davon abweichend wurde Üb I-(an-L) mit 1,5 mg Prot. und Üb I-(ae-D) mit 1,1 mg Prot. zugegeben, Veränderung der Temperatur wie angegeben, Reaktionsbeginn durch Zugabe des Extraktes b_1 und b_2: Temperaturabhängigkeit der NADH-Oxidase-Aktivität in der Arrhenius-Auftragung, berechnet aus Abb. V 4a.

-○- = ae-D --□-- = an-L

aktionsmechanismus abhängt. Dies ist im allgemeinen bei enzymatisch katalysierten Umsetzungen kaum möglich (WIEGEL, 1974) und im speziellen Fall des NADH-Oxidase-Systems, bei dem weder Anzahl der Reaktionspartner noch Reaktionsmechanismus bekannt sind, nicht sinnvoll. Von der Berechnung der Aktivierungsenthalpie wurde daher abgesehen.

Berechnung der Arrhenius-Aktivierungsenergie:

Die Berechnung erfolgte aus der Steigung der graphischen Auftragung von log k gegen 1/T in Abb. V 4 b_1 und b_2. Die Steigung der Geraden in der Auftragung für aerobe Zellen (b_1) hatte zwischen Knickpunkt und dem Maximum und dem Knickpunkt und dem Ende der Geraden gleiche Werte, und zwar $-1{,}026 \cdot 10^3$; daraus folgt $E_A = (1{,}5 \cdot 10^3) \cdot 4{,}576 = 6864$ cal/Mol. Die in der Auftragung für phototrophe Zellen (Abb. V 4 b_2) erreichte Steigung zwischen dem Knickpunkt und dem Ende der Geraden hatte den Wert $-3{,}803 \cdot 10^3$; $E_A = 17402$ cal/Mol.
Der große Unterschied zwischen der Aktivierungsenergie der NADH-Oxidase von aerob im Dunkeln und anaerob im Licht gewachsenen Zellen läßt auf temperaturbedingte Konformationsänderungen an einer oder mehreren Komponenten des NADH-Oxidasesystems schließen.

Substratsättigung

Bei der Aufnahme der Substratsättigungskurve der NADH-Oxidase für NADH mußte berücksichtigt werden, daß die NADH-Oxidase ein Enzymsystem darstellt, an welchem eine zunächst noch unbekannte Anzahl von Enzymen beteiligt ist. Diese Enzyme bedingen die Eigenschaften der NADH-Oxidase, was bedeutet, daß sowohl jedes einzelne Enzym dieses Systems als auch mehrere gleichzeitig den Ablauf der Reaktion limitieren können und folglich bei der Aufnahme der Substratsättigung ein Enzym oder mehrere zur Wirkung kommen können. Der Zweck der hier durchgeführten Charakterisierung der Enzyme im allgemeinen und der NADH-Oxidase im besonderen ist nicht die Erforschung des Aufbaues, sondern vielmehr

die Feststellung von Unterschieden in den ETS-Systemen zur oxidativen Energiegewinnung, welche in phototroph und chemotroph gewachsenen Zellen gebildet werden. Die hier gewonnenen Werte der Substratsättigung stellen daher nicht absolute, sondern nur relative Parameter zur Beurteilung der Oxidase dar.

Im vorhergehenden Abschnitt wurden für phototroph und chemotroph gewachsene Zellen von Rp. acidophila unterschiedliche pH-Optima gefunden; aus diesem Grunde wurde die der Substratsättigung bei pH 5,0 - 5,5 und pH 8,0 aufgenommen. Außerdem wurden Substratsättigungskurven bei pH 7,0 und pH 7,5 aufgenommen, da bei diesen pH-Werten die Hemmstoffversuche durchgeführt wurden.
Die Auftragung der Abhängigkeit der Reaktionsrate von der NADH-Konzentration zeigte im Üb I aus phototrophen Zellen sowohl bei pH 5,0 als auch bei pH 7,5 einen hyperbolischen Kurvenverlauf (Abbildung V 5a). Die beiden Reaktionen folgten der Michaelis-Menten-Kinetik. Die durch die Lineweaver-Burk-Auftragung (1/V gegen 1/1 S) ermittelten K_m-Werte (Abbildung V 5b) betrugen K_m = 25 uM bei pH 5,0 und K_m = 22 uM bei pH 7,5. Die K_m-Werte bei pH 5,0 und bei pH 7,5 unterschieden sich geringfügig, die relativ hohe Substrataffinität bei pH 5,0 steht im Einklang mit dem pH-Optimum. Die höhere v_{max} bei pH 7,5 gegenüber pH 5,0 in Abbildung V 5a kommt dadurch zustande, daß für die Versuche bei pH 7,5 ein Üb I mit viel höherer Aktivität verwendet wurde (vgl. Kap. V 1a) als bei pH 5,0.

Auch beim Üb I aerob gewachsener Zellen folgte die Reaktion der Michaelis-Menten-Kinetik. Die Substratsättigungskurven wurden für pH 8,0, pH 7,0 und pH 5,5 aufgenommen, von welchen nur die letztere in Abbildung V 6a dargestellt ist. Bei NADH-Konzentrationen oberhalb 80 uM fand eine starke Substrathemmung statt, die besonders deutlich in der Lineweaver-Burk-Auftragung (Abbildung V 6b) zum Ausdruck kommt. Die K_m-Werte, die aus den Schnittpunkten $1/K_m$ von Lineweaver-Burk-Auftragungen der Substratsättigungskurven ermittelt wurden sind:

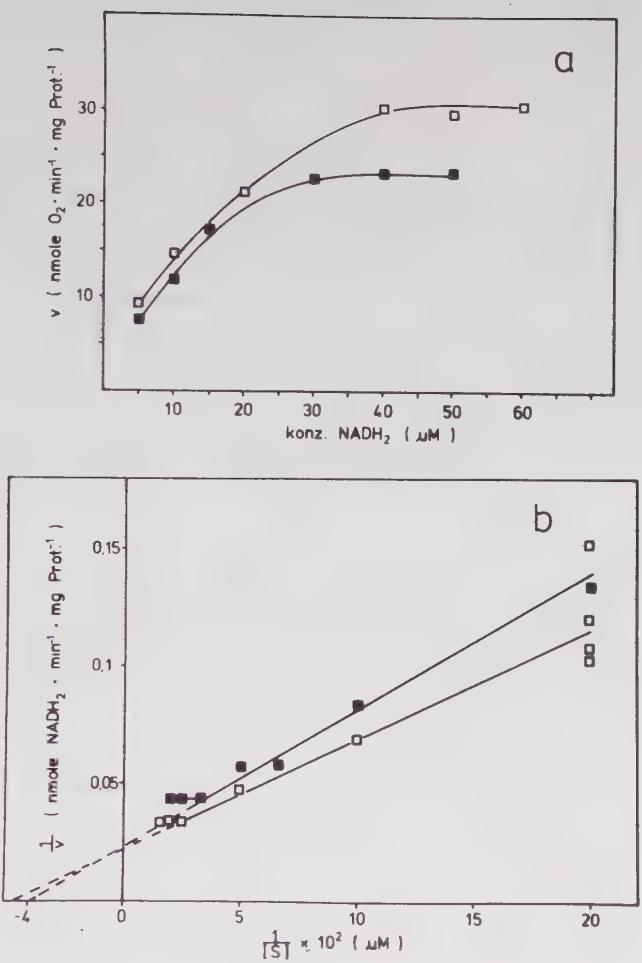


Abb. V 5a: Abhängigkeit der Aktivität der NADH-Oxidase-Aktivität von der NADH-Konzentration in der Üb I-Fraktion aus anaerob im Licht angezogenen Zellen von Rp. acidophila.

Aktivitätsbestimmung photometrisch bei 340 nm. Reaktionsansatz: für pH 5,0 Citrat-Puffer 50 mM oder für pH 7,5 PO_4-Puffer 50 mM; 25°C; die NADH-Konz. wurde wie angegeben verändert. Üb I mit 1,6 mg Prot.; aqua dest. ad 1,0 ml. Reaktionsbeginn mit NADH.
b: Lineweaver-Burk-Auftragung zu Abb. V 5a.
□ = pH 7,5 ■ = pH 5,0

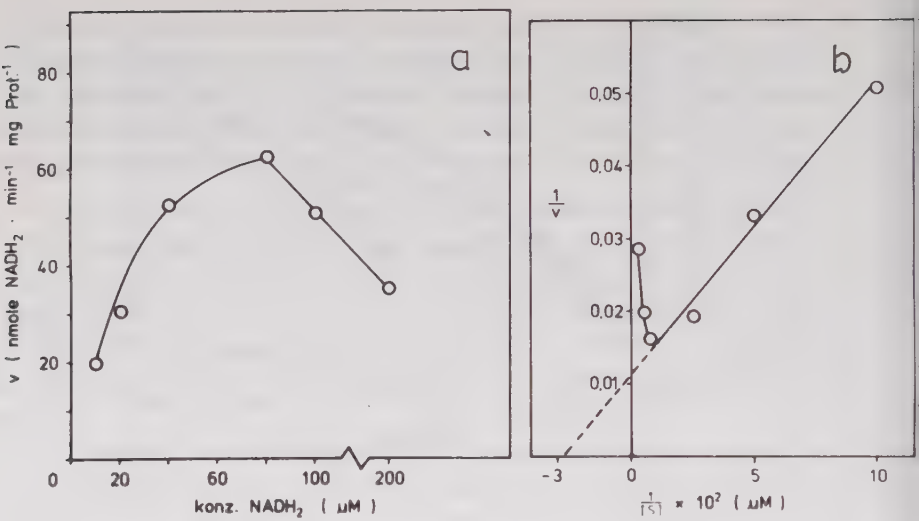


Abb. V 6a: Abhängigkeit der Aktivität der NADH-Oxidase von der NADH-Konzentration in der Ub I-Fraktion von aerob im Dunkeln angezogenen Zellen von Rp. acidophila.

Aktivitätsbestimmung wie Abb. V 5a, davon abweichend pH 5,5 und Ub I mit 0,33 mg Prot.

b: Lineweaver-Burk-Auftragung zu a.

pH 8,0 K_m = 25 uM
pH 7,0 K_m = 35 uM
pH 5,5 K_m = 45 uM

Auffallend ist, daß hier der geringste K_m-Wert bei dem pH-Wert gefunden wurde, der dem pH-Optimum entspricht. Vergleicht man die Substrataffinitäten phototropher und aerober Zellen, so wird deutlich, daß sich die K_m-Werte bei Veränderung des pH-Wertes nicht in dem Ausmaß verändern, wie es aus dem pH-Optimum erwartet werden könnte. Dies bedeutet, daß sowohl die phototroph als auch die aerob gewachsenen Zellen über ein NADH-Oxidase-System verfügen, welches in beiden pH-Bereichen wirksam ist, aber in aeroben Zellen der pH-Optimum stärker ausgebildet ist.

Die hier gefundenen K_m-Werte liegen nahe an dem bei R. rubrum bestimmten Wert (K_m = 22 uM, TANIGUCHI u. KAMEN, 1965).

Hemmung durch spezifische Inhibitoren:

Die Wirkungsorte spezifischer Hemmstoffe des ETS sind bisher am ausführlichsten in mitochondrialen ETS untersucht worden; die Ergebnisse lassen sich nur bedingt auf bakterielle Elektronentransportsysteme übertragen, da diese z. T. andere Elektronentransportkomponenten aufweisen. In beiden ETS ist jedoch die Anordnung der gemeinsamen Komponenten vergleichbar, so daß die Befunde an mitochondrialen ETS mit einigen Vorbehalten zur Interpretation der Hemmstoffwirkung an bakteriellen Systemen herangezogen werden können.
Die bisherigen Ergebnisse über die Hemmwirkung von CN^- in zellfreien Systemen von Bakterien zeigen, daß CN^- eine unterschiedlich starke Bindung an Endoxidasen eingehen kann. So fanden JONES und REDFEARN (1967) eine vollständige Unterbindung des Elektronentransportes durch CN^- bei Vorhandensein der Cytochrome vom a-Typ als Endoxidase, während THORE et al. (1969) keine vollständige Hemmbarkeit bei Cytochromen vom o-Typ nachweisen konnten. THORE et al. fanden bei R. rubrum eine Änderung der CN^--Hemmung, wenn Zellen nach phototrophem Wachstum aeroben Wachstumsbedingungen ausgesetzt wurden.
Um die unterschiedlichen CN^--Hemmungen der Oxidasen bei aeroben und phototrophen Zellen herauszustellen, wurden sie graphisch dargestellt. Die Hemmwirkung der Inhibitoren des Elektronentransportbereiches vom Elektronendonator bis zur Endoxidase wurde aus Platzgründen in den Tabellen V 8 bis V 11 zusammengefaßt.

Die Hemmstoffversuche mit KCN wurden bei pH 7,0 durchgeführt, da bei dieser Wasserstoffionenkonzentration das KCN vollständig dissoziiert vorliegt. In Abb. V 7 fällt die höhere Hemmbarkeit der NADH-Oxidase aerober Zellen auf, wo die 50%-Hemmung bei

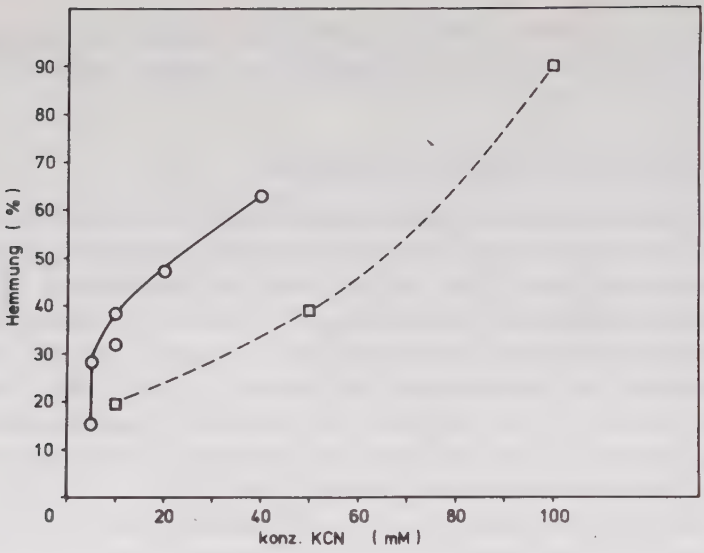


Abb. V 7: Hemmung der NADH-Oxidase durch KCN bei pH 7,0 in der Üb I-Fraktion aus anaerob im Licht und aerob im Dunkeln angezogenen Zellen von Rp. acidophila

Aktivitätsbestimmung photometrisch bei 340 nm. Reaktionsansatz: PO_4-Puffer pH 7,0, 50 mM; 25°C; NADH 0,2 mM; Üb I-(an-L) mit 0,8 mg Prot. und Üb I-(ae-D) mit 1,0 mg Prot.; aqua dest. ad 1,0 ml. Die KCN-Lösung wurde täglich frisch angesetzt; nach Zugabe des KCN wurde der Reaktionsansatz 5 min inkubiert und die Reaktion dann durch Zugabe des NADH eingeleitet.

-○- = ae-D --□-- = an-L

einer Konzentration von 22 mM erreicht wird, während diese bei anaeroben Zellen erst bei 65 mM auftritt (auf gleiche Proteinmenge bezogen, sogar 81 mM, s. Abb. V 7). Im Vergleich dazu wurde diese Hemmung bei Staphylococcus aureus und Azotobacter vinelandii bei 1 mM erreicht (TABER u. MORRISON, 1964; JONES u. REDFEARN, 1966), bei aerob gewachsenen R. rubrum sogar bei 0,3 mM KCN. Interessant ist, daß bei Rp. acidophila die Hemmbarkeit der NADH-Oxidase durch KCN in aeroben Extrak-

ten um den Faktor 4 höher war als bei phototroph gewachsenen Zellen. Eine Zunahme der Hemmwirkung in aeroben Zellen konnte mit den in Tab. V 8 aufgeführten Hemmstoffen nicht gefunden werden. Von den beiden Hemmstoffen der NADH-Dehydrogenase, welche an der Sauerstoffseite des Flavoproteins zwischen Flavoprotein und dem Chinon eingreifen (GUTMAN et al., 1970), hatte Rotenon die gleiche Hemmwirkung bei beiden Zellarten; dagegen war die Hemmwirkung von Amytal in aeroben Zellen geringer.

Tab. V 8: Hemmung der NADH-Oxidase-Aktivität anaerob im Licht und aerob im Dunkeln gewachsener Zellen von Rp. acidophila durch spezifische Hemmstoffe der Atmungskette

Anzucht der Zellen	Hemmstoffkonzentration (mM) für 50% oder 40%*-Hemmung	
	an-L	ae-D
Amytal	10,00*	26,00
CCCP	0,04	0,14
HQNO	0,38	3,00
KCN	81,00	22,00
Rotenon	0,20	0,15
TTFB	1,50	2,25

Die Aktivitätsbestimmung der NADH-Oxidase erfolgte photometrisch oder polarographisch in der Üb I-Fraktion. Die Ergebnisse stellen Durchschnittswerte mehrerer Versuche dar.
Bestimmungsmethoden s. Abb. V 7 und V 3, abweichend davon enthielten die Reaktionsansätze 50 mM PO_4-Puffer pH 7,0 und Üb I mit etwa 1 mg Prot. Bei der Hemmung durch KCN enthielten die Reaktionsansätze nur 0,8 mg Prot. Üb I an-D. Der in der Tabelle angegebene Wert ist auf 1,0 mg bezogen. Alle Hemmstoffe, mit Ausnahme des Amytals und KCN, wurden in DMSO gelöst und den Vergleichsansätzen gleiche Mengen DMSO zugesetzt (Amytal und KCN siehe Legende Tab. V 9).

Einen gleichen Effekt zeigte der Entkoppler CCCP, bei dem im aeroben Üb I die Konzentration für die 50% Hemmung der NADH-Oxidase vervierfacht werden mußte, da CCCP eine Aufhebung der Hemmung der NADH-Oxidase durch Licht bewirkt (THORE et al., 1969) und somit an der Verbindungsstelle des oxidativen ETS zum cyclischen ETS wirksam ist, kann angenommen werden, daß der Elektronenübergang vom photosynthetischen ETS oder seiner Komponenten auf das oxidative ETS sich um den Faktor 4 verändert. Nach den Befunden von THORE und Mitarbeitern an R. rubrum ist der nicht KCN empfindliche Abschnitt des ETS, der in den phototrophen Zellen vorherrscht, leichter durch CCCP zu entkoppeln; dieser Befund ist auch für Rp. acidophila zutreffend.

HQNO, welches den Übergang der Elektronen vom Cyt.b zum Cyt.c verhindert (TABER u. MORRISON, 1964; JONES u. WHALE, 1970), hatte eine um den Faktor 8 geringere Hemmwirkung bei aeroben Zellen im Vergleich zu den phototrophen; daher scheinen im aeroben ETS Cytochrome vom b-Typ einen geringeren Anteil am NADH-Oxidase-System zu haben als im phototrophen System.
Der Hemmstoff TTFB, welcher in Mitochondrien eine Entkopplung der oxidativen Phosphorylierung bewirkt (BÜCHEL et al., 1965) und am bakteriellen ETS an der gleichen Stelle wie HQNO den Elektronentransport unterbrechen soll (THORE et al., 1969), bewirkte keine unterschiedliche Hemmung im oxidativen ETS aerober und phototropher Zellen. Bei R. rubrum fand THORE im aeroben ETS eine höhere Hemmung der NADH-Oxidase durch TTFB.

Die Änderung des pH-Optimums von pH 5,0 auf pH 8,0, die Abnahme der Arrhenius-Aktivierungsenergie um den Faktor 2 und die bei beiden Zellarten in Abhängigkeit vom pH-Wert unterschiedlichen K_m- bzw. $K_{0.5}$-Werte weisen auf eine strukturelle Änderung im NADH-Oxidase-System beim Übergang von phototrophen auf aerobe Wachstumsbedingungen hin. Diese Änderungen können durch die unterschiedliche Hemmung der spezifischen Inhibitoren lokalisiert werden: Der NADH-DH-Bereich ist vermutlich in beiden ETS gleich (Amytal, Rotenon); an der Verbindungsstelle UQ-Cyt.b, die gleichzeitig die Kopplungsstelle für den cyclischen Elektro-

nentransport ist, sind größere Unterschiede vorhanden (CCCP), obwohl hier die TTFB-Hemmung gleichartig ist. Ein unterschiedlicher Elektronenfluß ist auch im Cyt.b - Cyt.c-Bereich zu postulieren, wo im phototrophen ETS die NADH-Oxidase schon durch niedrige HQNO-Konzentrationen gehemmt wurde, während die Konzentrationen dafür im aeroben ETS bedeutend höher waren. Eine Änderung der Hemmbarkeit im Endoxidase-Bereich (KCN) um den Faktor 4 zeigt, daß auch hier eine Veränderung der Cytochromoxidase (n) stattgefunden hat (vgl. Schema V 3 und V 4 in Kap. VI).

B. Succinat-Oxidase

Die Succinat-Oxidase von Rp. acidophila war nur im Rohextrakt und im Sediment aktiv. Der Zusatz von Ub I oder Ub II zur Sed.-Fraktion ergab keine Aktivitätserhöhung. In den ersten 48 h nach dem Zellaufschluß hatte die Sed.-Fraktion eine endogene Atmung (O_2-Aufnahme ohne Zugabe von Substrat) die 41% der Sauerstoffaufnahme nach Zugabe des Succinats erreichte; etwa 70 h nach dem Aufschluß verringerte sich die endogene Atmung auf 24%. Die Aktivität der Succinat-Oxidase wurde immer abzüglich endogener Atmung angegeben; sie blieb in den ersten 50 - 70 h nach dem Aufschluß konstant, danach nahm sie um den Faktor 1,7 zu und veränderte sich in den darauffolgenden 2 - 3 Tagen nicht mehr.
Die Sed.-Fraktion wurde in den ersten 6 Tagen nach Aufschluß bei 2 - 4° C unter Stickstoffatmosphäre aufbewahrt.

pH-Optimum

Die höchste Aktivität konnte mit Glycylglycin-Puffer bei einem pH-Wert von pH = 7,0 festgestellt werden (Abb. V 8), mit Phosphat-Puffer war sie geringer, am niedrigsten war sie mit Tris-HCl-Puffer (Tris = Tris hydroxymethyl -aminomethan). Im Gegensatz zur NADH-Oxidase hatte das pH-Optimum der Succinat-Oxida-

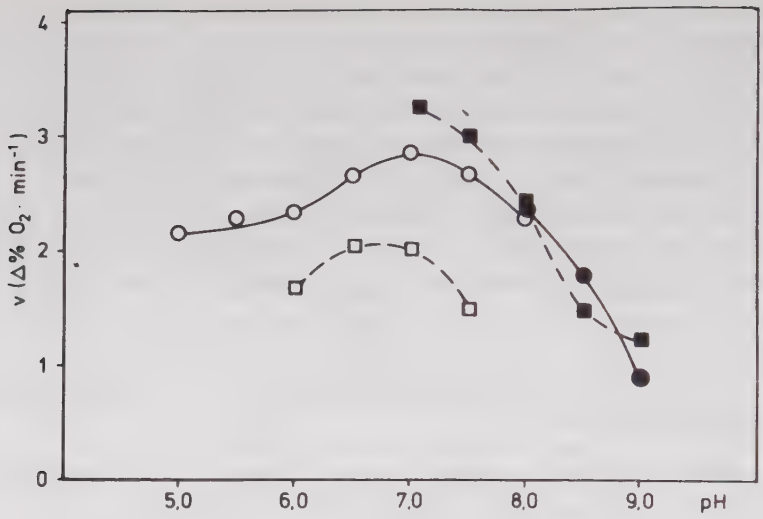


Abb. V 8: Abhängigkeit der Succinat-Oxidase-Aktivität von der Wasserstoffionenkonzentration bei der Sed.-Fraktion von aerob im Dunkeln und anaerob im Licht angezogenen Zellen von Rp. acidophila.

Aktivitätsbestimmung polarographisch.
Reaktionsansatz: Angegebener Puffer 50 mM; 30°C; Succinat 10 mM; Sed.-(ae-D) mit 4,3 mg Prot. und Sed.-(an-L) mit 13,3 mg Prot.; aqua dest. ad 3,0 ml. Reaktionsbeginn mit Succinat.

-○- -●- = Sed. ae-D --□- -■-- = Sed. an-L

□ ○ = PO_4-Puffer -●- = Borat-Puffer

■ = Glycylglycin-Puffer

% $O_2 \cdot min^{-1}$ = Änderung des Sauerstoffgehaltes (100% = Sauerstoffsättigung) im Reaktionsansatz.

se in der Sed.-Fraktion phototropher und aerober Zellen mit pH = 7,0 den gleichen Wert. Das pH-Optimum war nicht stark ausgeprägt und schwankte bei beiden Zellarten in vier Wiederholungen zwischen pH 6,5 und pH 7,0.

Temperaturoptimum

Die Aktivität der Succinat-Oxidase wurde bei verschiedenen Temperaturen im Bereich von 20° bis 50° C gemessen. Obwohl das Temperaturoptimum beider Zellarten im gleichen Bereich lag, war der Verlauf der Aktivitätskurven verschieden. In den aeroben Zellen (Abb. V 9a) ist das Optimum durch den steilen Anstieg bis 35°C und den ebenso steilen Abstieg danach scharf ausgeprägt; in den phototrophen Zellen (Abb. V 10a) ist der Anstieg bis 30°C gering und nimmt dann bis 35° stark zu, wonach die Kurve zwischen 35° und 40° C ein Plateau bildet. Dies deutet auf eine unterschiedliche temperaturbedingte Konformationsänderung in den beiden Oxidase-Systemen hin, die auf die unterschiedlichen Anzuchtbedingungen zurückzuführen ist.

Wie bereits in Kap. V 3a ausführlich dargestellt worden ist, konnte auch für die Reaktion der Succinat-Oxidase die Aktivierungsenergie aus der Arrhenius-Auftragung des Temperatur-Aktivität-Diagrammes ermittelt werden. Die Steigung der graphischen Auftragung von log k gegen 1/T betrug beim Sed. ae-D $-1{,}58 \cdot 10^3$ (Abb. V 9b) und beim Sed. an-L $-2{,}409 \cdot 10^3$ (Abb. V 10 b), daraus folgen E_A = 7260 cal/Mol und E_A = 11026 cal/Mol. Die bedeutend höhere Aktivierungsenergie beim Sed. aus phototrophen Zellen bestätigt die Vermutung aus dem unterschiedlichen Kurvenverlauf bei der Temperaturerhöhung, daß eine temperaturbedingte Konformationsveränderung vorliegt. Die Änderung der Aktivierungsenergie der NADH-Oxidase um den Faktor 2 bei aerobem und anaerobem Wachstum der Zellen ist ausgeprägter als bei der Succinat-Oxidase mit dem Faktor 1,5.

Substratsättigung

Die Substratsättigungskurven der Succinat-Oxidase wurden im Bereich von 0,03 bis 6 mM Succinat bestimmt. Die aus anaerob im Licht gewachsenen Zellen von Rp. acidophila erhaltene Substratsättigungskurve war hyperbolisch (Abb. V 11a). In der Line-

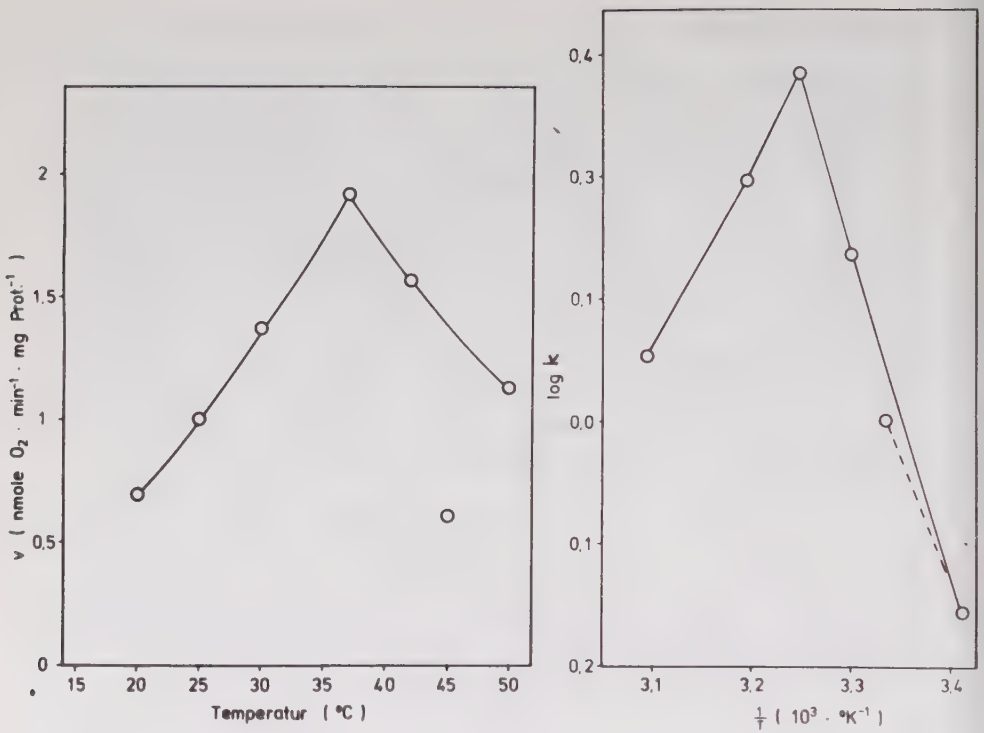
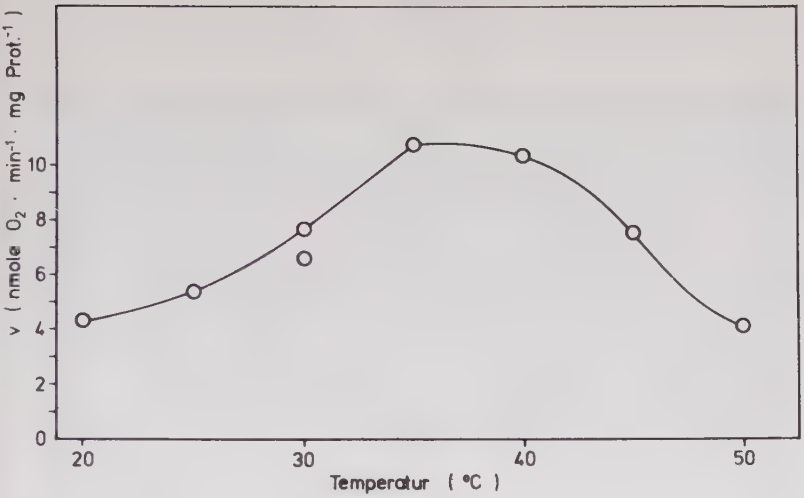


Abb. V 9a: Abhängigkeit der Succinat-Oxidase-Aktivität von der Inkubationstemperatur bei der Sed.-Fraktion von aerob im Dunkeln angezogenen Zellen von Rp. acidophila.

b: Temperaturabhängigkeit der Succinat-Oxidase-Aktivität in der Arrhenius-Auftragung, berechnet aus Abb. V 9a.

Aktivitätsbestimmung erfolgte polarographisch.
Reaktionsansatz: PO_4-Puffer pH 8,50 mM; Succinat 10 mM; Sed. mit 11,1 mg Prot.; aqua dest. ad 3,0 ml. Reaktionsbeginn mit Succinat. Veränderung der Temperatur wie angegeben.



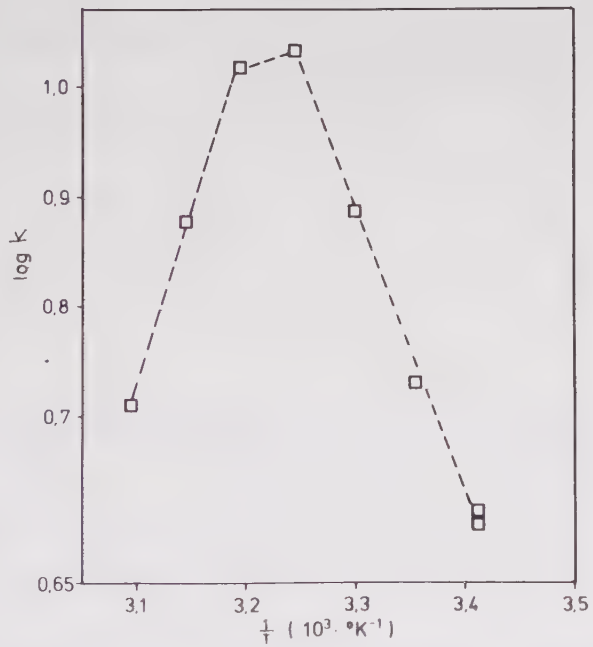


Abb. 10a: Abhängigkeit der Succinat-Oxidase-Aktivität von der Inkubationstemperatur der Sed.-Fraktion Rp. acidophila an-D.

b: Temperaturabhängigkeit der Succinat-Oxidase-Aktivität in der Arrhenius-Auftragung (sonstige Legenden wie Abb. a).

Aktivitätsbestimmung wie Abb. V 9, jedoch Protein = 5,6 mg und pH 7,6.

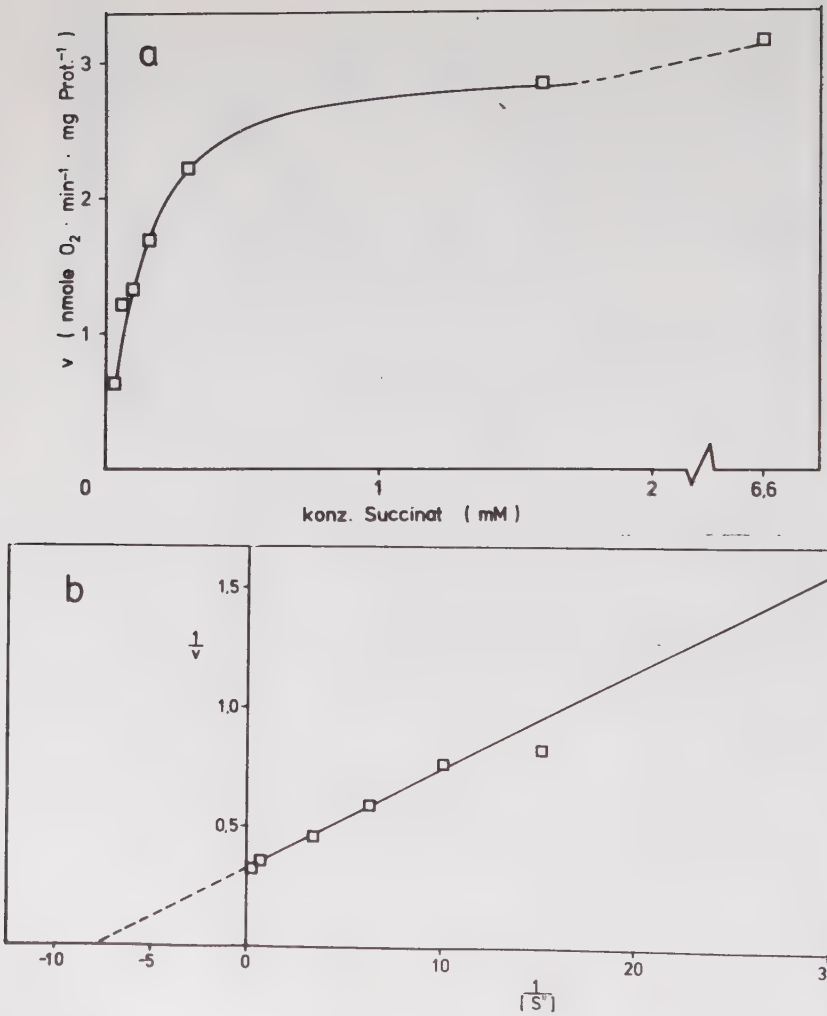


Abb. 11a: Abhängigkeit der Aktivität der Succinat-Oxidase von der Succinat-Konzentration aus anaerob im Licht angezogenen Zellen von Rp. acidophila.

Aktivitätsbestimmung wie Abb. V12; abweichend davon enthielt der Reaktionsansatz Sed. mit 6,7 mg Prot.

b: Lineweaver-Burk-Auftragung zu Abb. V 11a

weaver-Burk-Auftragung (Abb. V 11b) ergab sie eine Gerade, die die Abszisse im Punkt $1/K_m$ schnitt. Der Verlauf der Geraden zeigte, daß die Succinat-Oxidase der Michaelis-Menten-Kinetik folgte; daher kann der K_m-Wert aus dem Schnittpunkt $-1/K_m$ ermittelt werden: $1/K_m = -5,76$ mM; $K_m = 0,173$ mM.
Die Substratsättigungskurve der Sed.-Fraktion aus aeroben Zellen zeigte zwei Knickpunkte (Abb. V 12a). In der Lineweaver-Burk-Auftragung führt der erste Knickpunkt zu zwei Geraden (Abb. V 12b). Nach KOSHLAND et al. (1969) bedeuten abknickende Substratsättigungskurven negative Kooperativität. Es ist wenig wahrscheinlich, daß es sich in diesem Falle um eine negative Kooperativität (unterste Gerade in Abb. V 12b) und eine positive Kooperativität (oberste Gerade), wie sie für einzelne Enzyme gefunden wurde, handelt. Vielmehr muß angenommen werden, daß für die bei hoher und niedriger Substratkonzentration gemessene Reaktion jeweils ein anderes Enzym des Succinat-Oxidase-Systems reaktionsbestimmend ist.
Der K_m-Wert für das Enzym mit geringerer Substrataffinität ist 0,454 mM und der für das mit höherer Affinität 0,091 mM.
Der K_m-Wert des Anteiles im NADH-Oxidase-System aerober Zellen mit der höheren Affinität ist damit etwa um den Faktor 2 geringer als der K_m-Wert des reaktionsbestimmenden Anteils im NADH-Oxidase-System phototropher Zellen.

Hemmung durch spezifische Inhibitoren:

Die in Abschnitt ∝ ausführlich erläuterte Wirkungsweise der Hemmstoffe für die NADH-Oxidase trifft auch für die Succinat-Oxidase zu. Die in Abb. V 13 dargestellten Hemmkurven der Succinat-Oxidase mit KCN erreichen sowohl bei phototrophen (a) als auch bei chemotrophen (b) Zellen eine maximale Hemmung von 77%. Die KCN-Konzentrationen, die dazu benötigt wurden (100 µM KCN beim Sed. an-L und 20 µM KCN beim Sed.ae-D) unterschieden sich um den Faktor 5. Zur 50% Hemmung des Succinat-Oxidase-Systems war im Sed. aus anaerob im Licht gewachsenen Zellen 26 µM KCN erforderlich, bei den Zellen aus Wachstum aerob im Dunkeln so-

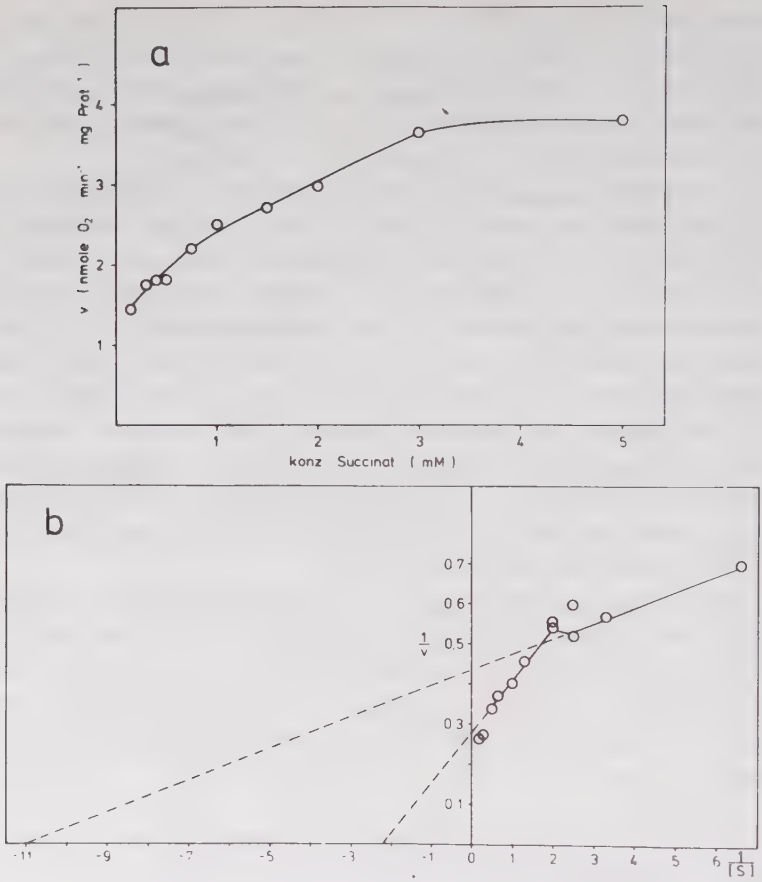


Abb. V 12a: Abhängigkeit der Aktivität der Succinat-Oxidase von der Succinat-Konzentration in der Sed.-Fraktion von aerob-Dunkel angezogenen Zellen von Rp. acidophila.

Aktivitätsbestimmung polarographisch. Reaktionsansatz: PO_4-Puffer pH 7,50 mM; 30° C; die Succinat-Konzentration wurde wie angegeben verändert; Sed. mit 9,8 mg Prot.; aqua dest. ad 3,0 ml. Reaktionsbeginn mit Succinat.

b: Lineweaver-Burk-Auftragung zu a.

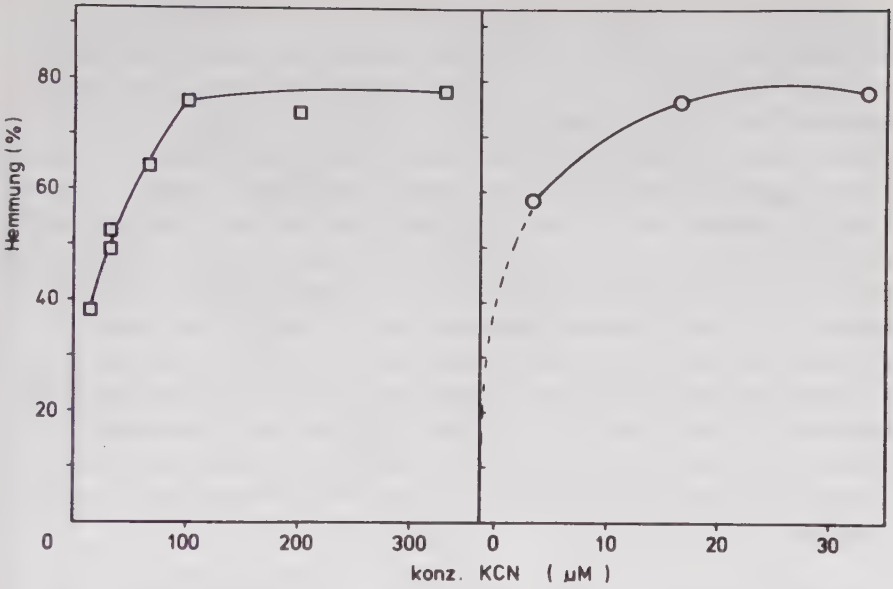


Abb. V 13: Hemmung der Succinat-Oxidase durch KCN bei pH 7,0 in der Sed.-Fraktion aus anaerob im Licht und aerob im Dunkeln angezogenen Zellen von Rp. acidophila

Aktivitätsbestimmung polarographisch.
Reaktionsansatz: PO_4-Puffer pH 7,0, 50 mM; 30° C; Succinat 10 mM; Sed.-(an-L) mit 3,8 mg Prot. und Sed.-(ae-D) mit 11,1 mg Prot.;aqua dest. ad 3,0 ml. Die KCN-Lösung wurde täglich erneut angesetzt; nach Zugabe des KCN wurde der Reaktionsansatz 5 min inkubiert und die Reaktion dann durch Zugabe des Succinats eingeleitet.

-□- = Sed. an-L -○- = Sed. ae-D

gar nur 2 µM KCN. Da das Sed. ae-D im Reaktionsansatz 11,1 mg Prot. enthielt, das an-L aber nur 3,8 mg Prot., ist die auf eine vergleichbare Menge Protein bezogene Hemmstoffkonzentration der aeroben Zellen 0,6 µM KCN. Die viel höhere Empfindlichkeit der Endoxidase aerober Zellen gegenüber CN^-, die in mehreren Wiederholungen bestätigt wurde, zeigt, daß sich beim Über-

gang von phototrophem zu aerobem Wachstum die Kopplungsstelle zum Sauerstoff stärker veränderte, als es bei der NADH-Oxidase der Fall war. Dies bedeutet, daß in aeroben Zellen zwei getrennte Endoxidasen jeweils für das Succinat-Oxidase- und das NADH-Oxidase-System vorhanden sein müssen. Gemeinsam ist den beiden Endoxidasen nur eine maximale Hemmbarkeit durch KCN von 77%. In aeroben Zellen von R. rubrum war die Succinat-Oxidase bei 300 µM KCN zu 100% gehemmt, die 50% Hemmung stellte sich bei 10 µM KCN ein (TANIGUCHI u. KAMEN, 1965). Diese Hemmung konnte mit einer Cytochromoxydase vom "o"-Typ in Verbindung gebracht werden. Die Cytochromanalysen zeigten in aeroben Zellen von Rp. acidophila zwei Cytochrome, die CO binden konnten, während in phototrophen Zellen nur ein solches Cytochrom vorhanden war. Offensichtlich ist die hohe CN^--Hemmbarkeit der Succinat-Oxidase auf eine der aeroben CO-bindenden Cytochrom-Oxidasen zurückzuführen.

Vergleicht man die Hemmwirkung aller eingesetzten Hemmstoffe (Tab. V 9), so zeigt sich, daß im Bereich der Succinat-DH die unterschiedliche Hemmwirkung bei phototrophen und aeroben Zellen durch Rotenon die gleiche ist wie bei der NADH-Oxidase, die Hemmung durch Rotenon aber um den Faktor 20 verschieden ist, was auf einen unterschiedlichen Transport von Reduktionsäquivalenten in diesem Bereich hinweist. CCCP zeigte im Vergleich zur NADH-Oxidase eine entgegengesetzte Erhöhung der Hemmbarkeit, und zwar eine 50% Hemmung des Sed. ae-D schon bei 6 µM, während die gleiche Hemmung beim Sed. an-L erst bei 335 µM CCCP eintrat. Die Hemmbarkeit durch HQNO im Cyt.b-Cyt.c-Bereich wurde geringer, was auch bei der NADH-Oxidase festgestellt wurde. Die Hemmung durch TTFB nahm in den aeroben Zellen um den Faktor 10 zu im Vergleich zu den phototrophen Zellen.
Ähnlich wie bei der NADH-Oxidase lassen die geringere Aktivierungsenergie und die höhere Substrataffinität der Succinat-Oxidase aerober Zellen im Vergleich zu der phototropher Zellen vermuten, daß eine Änderung von ETS-Komponenten stattgefunden hat. Besonders deutlich wird dies in der Lineweaver-Burk-Auf-

Tab. V 9: Hemmung der Succinat-Oxidase-Aktivität von anaerob im Licht und aerob im Dunkeln angezogenen Rp. acidophila durch spezifische Hemmstoffe der Atmungskette

Anzucht der Zellen	Hemmstoff-Konz. für 50% Hemmung Konz. (mM) an-L	ae-D	max. gemessene Hemmung (%) bei der angegebenen Konz. Konz. (mM)	
Amytal	14,6	7,05	85%	16,5
CCCP	0,335	0,006	85%	0,065
HQNO	0,4	0,12		
KCN	0,026	0,002	77% 77%	0,100 0,200
Rotenon	5,0	0,225		
TTFB	1,6	0,15	85% 80%	7,5 3,3

Die Aktivitätsbestimmung der Succinat-Oxidase erfolgte polarographisch oder manometrisch. Reaktionsansatz: PO_4-Puffer 50 mM, pH 7; Succinat 10 mM; Sed.-(ae-D) oder (an-L) mit jeweils vergleichbaren Proteinmengen (KCN-Hemmung s. Abb. V); aqua dest. ad 3,0 ml (polarographisch) oder 2,0 ml (manometrisch). Abweichend davon enthiel der Seitenarm des Reaktionsgefäßes bei der manometrischen Bestimmung 0,2 ml NaOH 10%/w/v).
Der Reaktionsansatz (ohne Succinat) wurde 5 min vor Reaktionsbeginn mit dem Hemmstoff inkubiert. Reaktionsbeginn durch Zugabe des Succinats.
Alle Hemmstoffe mit Ausnahme des Amytals und KCN wurden in DMSO gelöst, den Vergleichsansätzen wurden gleiche Mengen DMSO zugesetzt. Amytal wurde in 0,1 M PO_4-Puffer pH 7,0 suspendiert und 0,5 M NaOH solange zugegeben, bis sich der Hemmstoff gelöst hatte (TABER u. MORRISON, 1964). KCN wurde täglich frisch in aqua dest. gelöst.

tragung, wo im aeroben Sed. zwei "Kooperativitäten" auftreten, im Gegensatz zum Sed. phototropher Zellen, wo nur ein K_m-Wert festgestellt werden konnte.
Die Wirkung der Inhibitoren läßt den Schluß zu, daß der Elektronentransportweg der Succinat-Oxidase im Teilbereich UQ - O_2 von dem der NADH-Oxidase unterschiedlich ist, besonders der Endoxidasebereich, der eine viel höhere Empfindlichkeit gegenüber CN^- aufweist. Es kann vermutet werden, daß hier der für die höhere Substrataffinität verantwortliche Elektronenübertragungsbereich lokalisiert ist. Die große Hemmwirkung von TTFB im aeroben ETS steht im Einklang mit Befunden an R. rubrum (THORE et al., 1969), wo in aeroben Zellen ein gegenüber TTFB und KCN empfindlicher Elektronentransportweg ausgebildet wurde, der in phototrophen Zellen nur eine geringere Rolle spielte.
Die zwei Substrataffinitäten bei Rp. acidophila und die Wirkung von TTFB und KCN lassen vermuten, daß hier in aeroben und phototrophen Zellen zwei ETS vorhanden sind, ein KCN-hemmbares (77% durch KCN hemmbar) und ein nicht durch KCN hemmbares. In phototrophen Zellen dürfte das nicht durch KCN und TTFB hemmbare System den größten Teil der Reduktionsäquivalente übertragen, während in aeroben Zellen das TTFB und KCN-hemmbare System diese Funktion übernehmen dürfte (siehe Schema V 3 und V 4 in Kap. VII).

b. Rhodospirillum fulvum

Die Anzucht der chemotrophen Zellen zur Charakterisierung der NADH- und Succinat-Oxidase erfolgte mikroaerob im Dunkeln im pO_2-Optimum (pO_2 10 - 11 Torr).

α NADH-Oxidase

Die Prüfung der NADH-Oxidase in der vesikulären Fraktion (Sed.) und der löslichen Fraktion (Üb I) ergab in beiden Fraktionen gleiche pH-Optima und ähnliche $K_{0.5}$-Werte; auch nach Zusatz von

Anionen und Kationen zeigten sich keine Unterschiede. Daher wurde davon ausgegangen, daß die NADH-Oxidase in beiden Fraktionen weitgehend identisch ist. Da die Aktivität im optischen Test bestimmt werden sollte, wurde ausschließlich die lösliche Fraktion (Üb I) zur Charakterisierung des Enzyms eingesetzt.

pH-Optimum und Stabilität

Wie bereits bei der NADH-Oxidase von Rp. acidophila festgestellt (Abschn. 3 aα), wurde auch hier die höchste Aktivität mit Phosphat-Puffer gefunden. Im Unterschied zu Rp. acidophila war das Optimum in der Üb I-Fraktion phototroph und mikroaerob gewachsener Zellen gleich und lag bei pH 6,0 (Abb. V 14). Das pH-Optimum im Üb I aus phototrophen Zellen war nicht so ausgeprägt wie in mikroaerob gewachsenen Zellen. Die Aktivitätsunterschiede zwischen pH 5,0 und pH 6,0 waren in phototrophen Zellen relativ gering, womit sich eine gewisse Ähnlichkeit zur NADH-Oxidase der phototrophen Zellen von Rp. acidophila feststellen läßt, welche ihr Optimum bei pH 5,0 hatte. Die stärkere Ausprägung des pH-Optimums mikroaerober Zellen kann als eine, wenn auch begrenzte Änderung durch die mikroaeroben Wachstumsbedingungen angesehen werden.

Die Stabilität der NADH-Oxidase war am höchsten, wenn die zellfreien Extrakte in 50 mM Phosphatpuffer bei 2 - 4° C unter Stickstoffatmosphäre aufbewahrt wurden. Tägliche Messungen im Zeitraum von vier Tagen nach dem Zellaufschluß ergaben bei derart aufbewahrten Zellen keinen Aktivitätsverlust. Ein bei -20° C gelagerter Üb I zeigte im gleichen Zeitraum einen Aktivitätsverlust von 12%.

Temperatur-Optimum

Die Abhängigkeit der Reaktionsrate der NADH-Oxidase von der Temperatur wurde im Bereich von 10° bis 45° C geprüft. Die Tem-

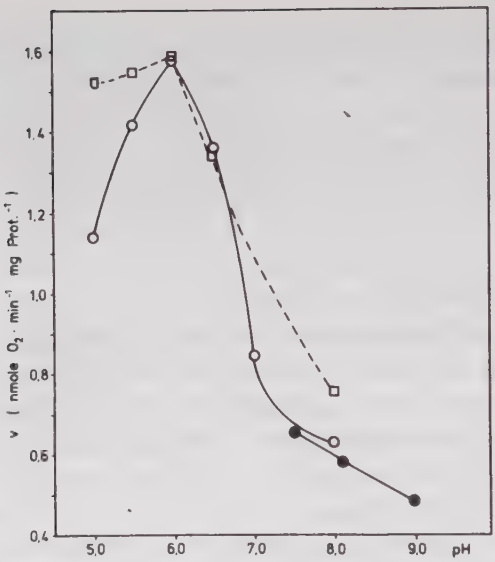


Abb. V 14: Abhängigkeit der NADH-Oxidase-Aktivität von der Wasserstoffionenkonzentration in der Üb I-Fraktion aus anaerob im Licht und mikroaerob im Dunkeln gewachsenen Zellen von R. fulvum.

Aktivitätsbestimmung photometrisch bei 340 nm.
Reaktionsansatz: Puffer nach Angabe 50 mM; 25°C; NADH 0,080 mM; Üb I-(an-L) mit 3,7 mg Prot. und Üb I-(mae-D) mit 1,7 mg Prot.; aqua dest. ad 1,0 ml. Reaktionsbeginn durch Zugabe des NADH.

-○- = mae-D mit PO_4-Puffer

-●- = mae-D mit Glycylglycin-Puffer

-□- = an-L mit PO_4-Puffer

peraturkurven phototroph und mikroaerob gewachsener Zellen hatten einen ähnlichen Verlauf (Abb. V 15a); ab 20° C war ein steiler Anstieg der Aktivität bis zum Maximum bei 45° C zu verzeichnen; bei weiterer Temperaturerhöhung nahm die Temperaturkurve ebenso steil wieder ab.

Das Vorgehen zur Ermittlung der Arrhenius-Aktivierungsenergie ist in Abschn. 3a(α) dargestellt worden. Aus der graphischen Auf-

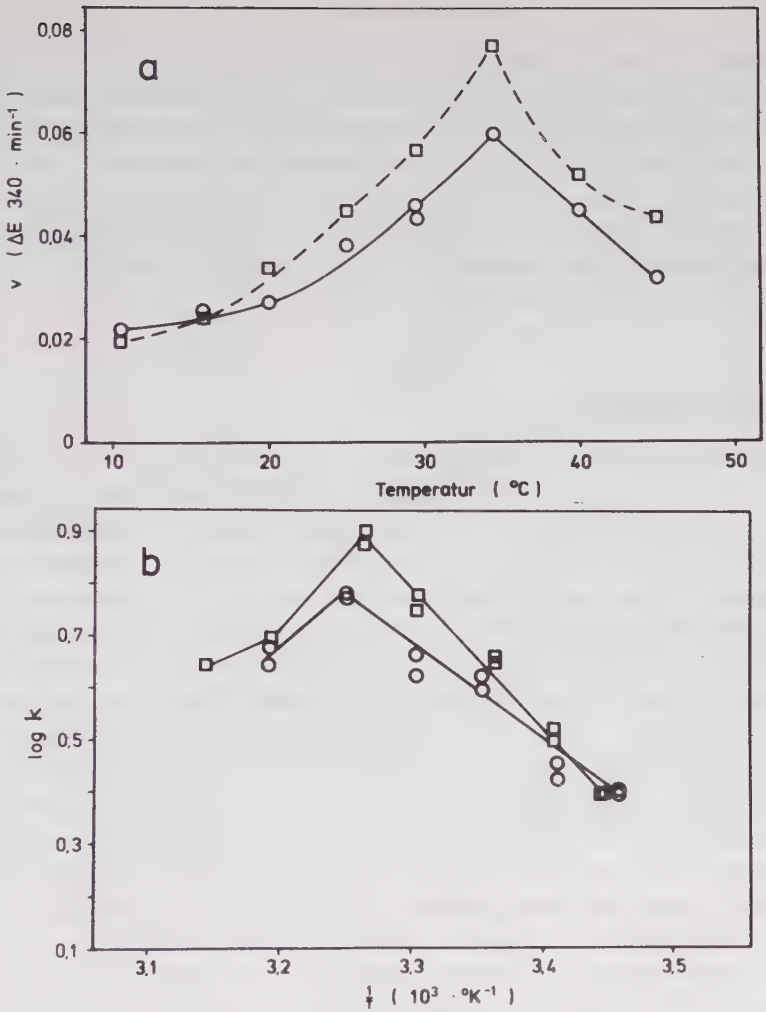


Abb. V 15 a: Abhängigkeit der NADH-Oxidase-Aktivität von der Inkubationstemperatur in der Üb I-Fraktion aus anaerob im Licht und mikroaerob im Dunkeln gewachsenen Zellen von R. fulvum.

Aktivitätsbestimmung photometrisch bei 340 nm.
Reaktionsansatz wie Abb. V 14, davon abweichend PO_4-Puffer 100 mM pH 6,0 und Üb I-(an-L) mit 1,3 mg Prot. und Üb II-(mae-D) mit 1,6 mg Prot.

b: Temperaturabhängigkeit der NADH-Oxidase-Aktivität in der Arrhenius-Auftragung, berechnet aus Abb V 15a.

-O- = mae-D -□- = an-D

tragung von log k gegen 1/T (Abb. V 15b) wurde für phototrophe Zellen eine E_A von 11.162 cal/Mol und für mikroaerobe Zellen eine E_A von 8.955 cal/Mol ermittelt. Die Aktivierungsenergie der NADH-Oxidase beider Zellarten unterscheidet sich um den Faktor 1,25.
Auch in R. fulvum läßt sich also eine temperaturbedingte Konformationsänderung nachweisen, die jedoch im Vergleich zu Rp. acidophila sehr gering sein muß.

Substratsättigung

Die Abhängigkeit der Aktivität von der Substratkonzentration wurde im Bereich von 0,01 bis 0,40 mM NADH bestimmt. Für mikroaerobe Zellen ergab sich ein hyperbolischer Kurververlauf. Mit phototrophen Zellen war der Anstieg der Sättigungskurve dagegen bis zu einer Konzentration von 0,1 mM geradlinig. Eine Substrathemmung, die in der Lineweaver-Burk-Auftragung besonders deutlich in Erscheinung tritt (Abb. V 16b), war in beiden Zellarten bei 0,30 mM NADH feststellbar. Bei diesem Wert stellte sich in beiden NADH-Oxidase-Systemen auch die Substratsättigung ein.
Wie bei Rp. acidophila (3 aα) zeigt die Lineweaver-Burk-Auftragung einen abknickenden Kurvenverlauf, was auf die Beteiligung zweier reaktionsbestimmender Komponenten schließen läßt. Da nur wenige Auftragungspunkte den Verlauf der Geraden bis zum Schnittpunkt auf der Abzisse $-1/K_m$ bestimmen, erscheinen die so ermittelten K_m-Werte (an-L K_m 11 u. 80 µM; mae-D K_m 25 u. 181 uM) nicht genügend gesichert. Aus diesem Grunde wurden die Substratkonzentrationen für die halbmaximale Reaktionsgeschwindigkeit ($K_{0.5}$) aus Abb. 16 a graphisch ermittelt: für phototrophe Zellen war $K_{0.5}$ = 65 µM und für mikroaerobe Zellen $K_{0.5}$ = 62 µM. Beide Werte unterscheiden sich nur geringfügig, dennoch kann in Anbetracht des unterschiedlichen Verlaufes der Substratsättigungskurven und den unterschiedlichen K_m-Werten aus der Lineweaver-Burk-Auftragung eine gewisse

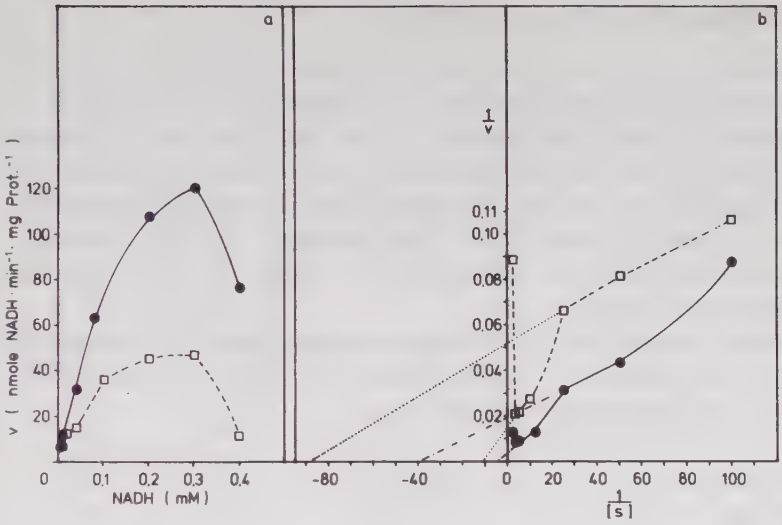


Abb. V 16a: Abhängigkeit der NADH-Oxidase-Aktivität von der NADH-Konzentration in der Üb I-Fraktion aus anaerob im Licht und mikroaerob im Dunkeln gewachsenen Zellen von R. fulvum.

Aktivitätsbestimmung photometrisch bei 340 nm.
Reaktionsansatz: PO_4-Puffer 100 mM pH 6,0; 25°C; die NADH-Konz. wurde wie angegeben verändert; Üb I-(an-L) mit 2,8 mg Prot. und Üb I-(mae-D) mit 1,2 mg Prot.; aqua dest. ad 1,0 ml. Reaktionsbeginn durch Zugabe des NADH.

b: Lineweaver-Burk-Auftragung zu a.

-●- = mae-D --□-- = an-L

Veränderung der Eigenschaften der NADH-Oxidase mit den Wachstumsbedingungen postuliert werden. Diese Änderungen können aber nicht so tiefgreifend sein wie im NADH-Oxidase-System von Rp. acidophila.

Abschließend kann festgestellt werden, daß die NADH-Oxidase von R. fulvum sowohl in phototrophen wie in mikroaeroben Zellen zwei reaktionshemmende Komponenten aufweist, die vermutlich bei Änderung der Wachstumsbedingungen geringfügig verändert werden.

Hemmung durch spezifische Hemmstoffe

Mit Ausnahme von KCN und Amytal, die wasserlöslich sind, mußten die übrigen der hier angewendeten Hemmstoffe in DMSO gelöst werden. Äthanol und Methanol eignen sich gut als Lösungsmittel, konnten aber nicht verwendet werden, da die Zellfraktion von R. fulvum und Rp. acidophila Dehydrogenasen enthielten, welche sowohl Äthanol als auch Methanol als Elektronendonator verwenden konnten und damit die NADH- und Succinat-Oxidase-Reaktion störten.
DMSO wirkte hemmend auf beide Oxidasereaktionen. Im folgenden wird die DMSO-Hemmung der NADH-Oxidase aus dem Üb I mikroaerober Zellen von R. fulvum dargestellt:

DMSO-Konzentration (µl DMSO auf 1 ml)	Hemmung (%)
10	3
20	8
50	40
100	75
200	95

Die Hemmung durch DMSO im Üb I von R. fulvum anaerob-Licht und bei Rp. acidophila war ähnlich. Um den Anteil der DMSO-Hemmung herabzusetzen, wurden die Konzentrationen der Hemmstoffe so gewählt, daß nach Zugabe zum Reaktionsansatz keine Fällung auftrat. Durchschnittlich wurden 20 µl Hemmstofflösung zum Reaktionsansatz zugegeben.

Die Hemmkurven für KCN zeigten bei beiden Zellarten von R. fulvum einen vergleichbaren Verlauf (Abb. V 17). 50% Hemmung wurde in Üb I aus phototrophen Zellen bei 15 mM, in Üb I aus mikroaeroben Zellen bei 9 mM KCN gefunden, auf Protein bezogen betrugen die Konzentrationen 5,35 bzw. 5,29 mM. In einigen Versuchsansätzen wurde mit 200 mM KCN eine 100% Hemmung der NADH-Oxidase erreicht. Die KCN-Konzentrationen für eine 50% Hemmung liegen in der

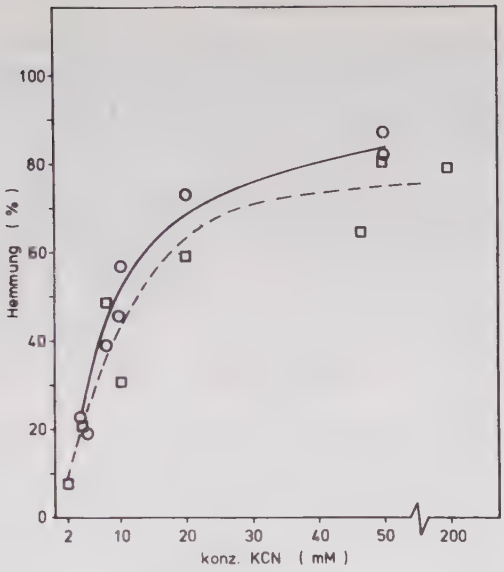


Abb. V 17: Hemmung der NADH-Oxidase durch KCN bei pH 6,0 in der Üb I-Fraktion aus anaerob im Licht und mikroaerob im Dunkeln gewachsenen Zellen von R. fulvum.

Aktivitätsbestimmung photometrisch bei 340 nm. Reaktionsansatz wie in Abb. V 16 a, davon abweichend NADH 0,2 mM, Üb I-(an-L) mit 2,8 mg Prot. und Üb I-(mae-D) mit 1,7 mg Prot., KCN nach Angabe. Der Reaktionsansatz wurde vor Reaktionsbeginn (durch Zugabe des NADH), 5 min mit dem KCN inkubiert.

—○— = mae-D ---□--- = an-L

Größenordnung der Werte für Rp. acidophila. Unterschiedliche Hemmwirkungen bei phototrophen und mikroaeroben Extrakten von R. fulvum waren nicht feststellbar, oder wenn man die Umrechnung auf Protein nicht vornimmt, nur um den Faktor 1,6 verschieden (Rp. acidophila Faktor 4,0).

Die Hemmwirkung weiterer spezifischer Hemmstoffe ist in Tab. V 10 angegeben. Die Unterschiede zwischen den Extrakten aus phototrophen und mikroaeroben Zellen sind verglichen mit Rp. acidophila gering. Immerhin ist die Hemmbarkeit durch Amytal

Tab. V 10: Hemmung der NADH-Oxidase-Aktivität von anaerob im Licht und mikroaerob im Dunkeln gewachsenen Zellen von R. fulvum durch spezifische Hemmstoffe der Atmungskette

Anzucht der Zellen	Hemmstoff-Konz. für 50% Hemmung Konz. (mM)* an-L	ae-D	max. gemessene Hemmung (%) bei der angegebenen Konz. Konz. (mM)*	
Amytal	1,97	1,26	73%	5,0
CCCP	0,093	0,082	100%	0,48
HQNO	0,109	0,075	100%	0,5
KCN	5,35	5,26	100%	200,0
Rotenon	0,059	0,044	100% 100%	0,5 0,4
TTFB	0,040	0,078	100%	10,0

Die Aktivitätsbestimmungen erfolgten photometrisch bei 340 nm. Reaktionsansatz: PO_4-Puffer 100 mM pH 6,0; 25°C; NADH 0,2 mM; Üb I mit 2-4 mg Prot.; Hemmstoffe nach Angabe; aqua dest. ad 1,0 ml. Mit Ausnahme von Amytal und KCN wurden alle Hemmstoffe in DMSO gelöst; die Vergleichsansätze enthielten gleiche Mengen DMSO. (Weitere Angaben in der Legende von Tab. V 8). Die Reaktionsansätze wurden 5 min vor Reaktionsbeginn (durch Zugabe des NADH) inkubiert.

* Die in der Tab. angegebenen Hemmstoffkonzentrationen sind auf 1 mg Üb I-Protein bezogen.

und HQNO in mikroaeroben Zellen etwa 1,5 mal höher als in phototrophen Zellen. TTFB bewirkt dagegen in mikroaeroben Zellen eine schwächere Hemmung. Daraus läßt sich ableiten, daß beim Übergang zum mikroaeroben Wachstum Veränderungen des NADH-Oxidase-Systems im Dehydrogenase- und Cyt.b-Cyt.c-Bereich stattfinden, sowie auch an der Verbindungsstelle zum cyclischen ETS.

β. Succinat-Oxidase

pH-Optimum

Die Reaktionsraten erreichten mit Phosphat-Puffer und Glycylglycin-Puffer gleiche Werte. Entsprechend den phototr
len von Rp. acidophila wurde im Sediment phototropher und mikroaerober Zellen von R. fulvum ein scharf ausgeprägtes pH-Optimum gefunden. Der pH-Wert für das Optimum liegt mit 8,0 über dem von Rp. acidophila (7,0).

Temperaturoptimum

Die Temperaturabhängigkeit der Reaktionsraten wurde im Bereich von 15° bis 50° (40°) C geprüft. Das Optimum lag für phototrophe wie mikroaerobe Zellen oberhalb des geprüften Temperaturbereiches (Abb. V 19a). Der steilere Anstieg der Kurve für mikroaerobe Zellen läßt vermuten, daß das Temperaturoptimum dieser Zellen bei einer niedrigeren Temperatur liegt als bei phototrophen Zellen.

Betrachtet man den mittleren Bereich der Kurven in der Arrhenius-Auftragung (Abb. V 19b), so findet man diesen Unterschied in der verschiedenen Steigung der Geraden für die phototrophen und mikroaeroben Zellen wieder; die daraus ermittelten Werte für die Arrhenius-Aktivierungsenergie (Ermittlungsverfahren s. Abschn. 3 aα) sind für phototrophe Zellen E_A = 20.450 cal/Mol und bei mikroaeroben Zellen E_A = 15.650 cal/Mol, d. h. der

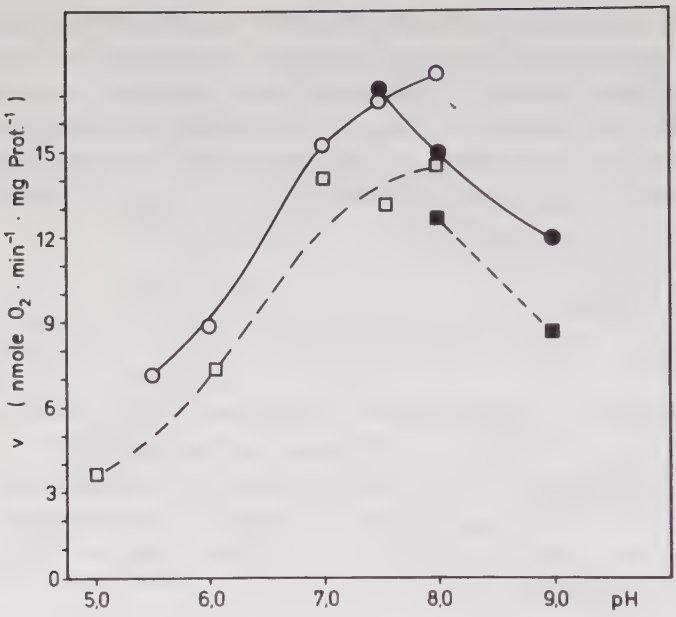


Abb. V 18: Abhängigkeit der Succinat-Oxidase-Aktivität von der Wasserstoffionenkonzentration in der Sed.-Fraktion aus anaerob im Licht und mikroaerob im Dunkeln gewachsenen Zellen von R. fulvum.

Aktivitätsbestimmung polarographisch. Reaktionsansatz: Puffer mit pH nach Angabe 100 mM; 30° C; Succinat 20 mM; Sed.-(an-L) mit 4,8 mg Prot. und mae-D mit 4,4 mg Prot.; aqua dest. ad 2,0 ml. Reaktionsbeginn durch Zugabe des Succinats.

○ □ = Glycylglycin-Puffer

● ■ = PO_4-Puffer

—○ ●- = mae-D

- - □ ■- = an-D

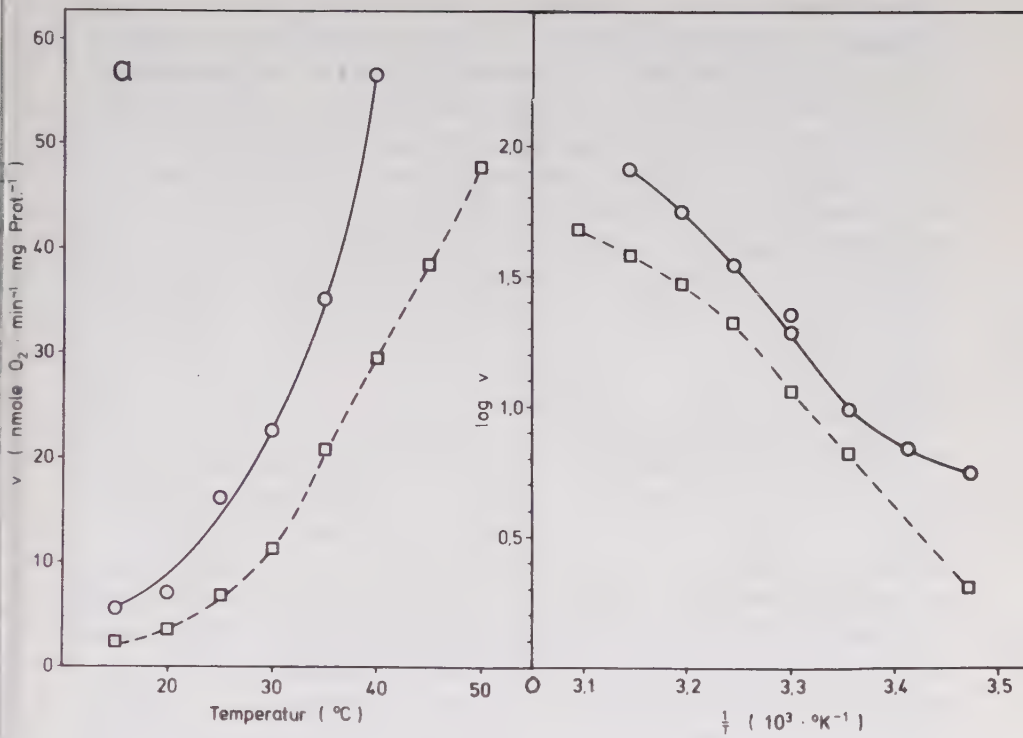


Abb. V 19a: Abhängigkeit der Succinat-Oxidase-Aktivität von der Inkubationstemperatur in der Sed.-Fraktion aus anaerob im Licht und mikroaerob im Dunkeln angezogenen Zellen von R. fulvum.

Aktivitätsbestimmung polarographisch. Reaktionsansatz wie Abb. V 18, abweichend davon PO_4-Puffer 100 mM pH 7,0; Sed.-(an-L) mit 5,2 mg Prot. und Sed. mae-D mit 2,8 mg Prot. Temperaturen wie angegeben.

b: Temperaturabhängigkeit der NADH-Oxidase-Aktivität in der Arrhenius-Auftragung, berechnet aus Abb. V 19a.

—— ○ —— = mae-D — — □ — — = an-L

E_A-Wert an-L ist um den Faktor 1,3 höher als E_A mae-D. In Rp. acidophila dagegen unterschieden sich die Werte um den Faktor 1,5, die Arrhenius-Aktivierungsenergie war bei den phototrophen Zellen um 9000 cal/Mol geringer als bei R. fulvum. Daraus ergibt sich, daß die Succinat-Oxidase von R. fulvum wohl eine temperaturbedingte strukturelle Veränderung bei Änderung der Wachstumsbedingungen vollziehen kann.
Die Übertragung der Reduktionsäquivalente von Succinat auf Sauerstoff ist jedoch energetisch weniger wirksam als bei Rp. acidophila.

Substratsättigung

Die Substratsättigungskurven wurden im Bereich von 0,125 bis 10,0 bzw. 25,0 mM Succinat bestimmt. Die Kurve war für beide Zellarten hyperbolisch (Abb. V 20a). Für mikroaerob gewachsene Zellen ergab sich bei der Lineweaver-Burk-Auftragung im Bereich niedriger Substratkonzentrationen eine Gerade (Abb. V 20b), der daraus ermittelte K_m-Wert betrug 0,5 mM. Die entsprechende Gerade für phototrophe Zellen knickte bei niedrigen 1/ S - Werten (entsprechend hoher Substratkonzentration) ab, so daß in Analogie zu den Befunden an einzelnen Enzymen (ausführliche Beschreibung in Abschn. 3 aβ) angenommen werden kann, daß zwei reaktionsbestimmende Komponenten im Succinat-Oxidase-System vorliegen, oder ein Enzym zwei Kooperativitäten aufweist. Die aus den beiden Geraden bestimmten K_m-Werte waren K_m = 0,5 mM und K_m = 1,17 mM. Daraus wird deutlich, daß sowohl das phototrophe als auch das mikroaerobe Succinat-Oxidase-System einen Enzymanteil mit gleicher Substrataffinität hatten und das phototrophe System zusätzlich noch eine Komponente mit einer geringeren Substrataffinität.
Die Verhältnisse bei der Succinat-Oxidase von R. acidophila waren entgegengesetzt, da dort nur das aerobe System zwei Substrataffinitäten besaß.

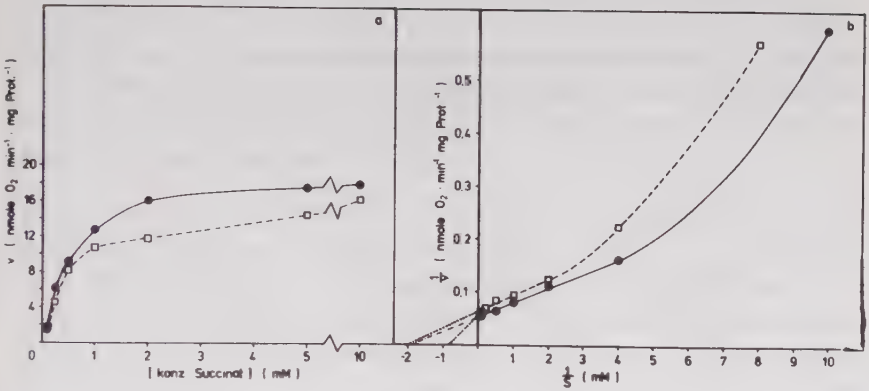


Abb. V 20a: Abhängigkeit der Succinat-Oxidase-Aktivität von der Succinat-Konzentration in der Sed.-Fraktion aus anaerob im Licht und mikroaerob im Dunkeln gewachsenen Zellen von R. fulvum.

Aktivitätsbestimmung polarographisch. Reaktionsansatz: PO_4-Puffer 100 mM pH 7,0; 30° C; Succinat-Konz. nach Angabe; Sed.-(an-L) mit 4,8 mg Prot. und mae-D mit 4,4 mg Prot.; aqua dest. ad 2,0 ml.

b: Lineweaver-Burk-Auftragung

○ = mae-D □ = an-L

Hemmung durch spezifische Inhibitoren

Die im vorangegangenen Abschnitt gemachten Ausführungen zum Einsatz der Hemmstoffe finden auch hier Anwendung, desgleichen die ausführliche Beschreibung der Wirkungsweise der Inhibitoren in Abschn. 3 aα.

Die Hemmkurve für KCN wurde im Bereich von 0,10 bis 3,00 mM KCN ermittelt. Die maximale Hemmung im Sed. phototropher Zel-

lenwar 92% bei 1 mM KCN und die Sed. mikroaerober Zellen 86% bei 3 mM KCN (Abb. V 21).

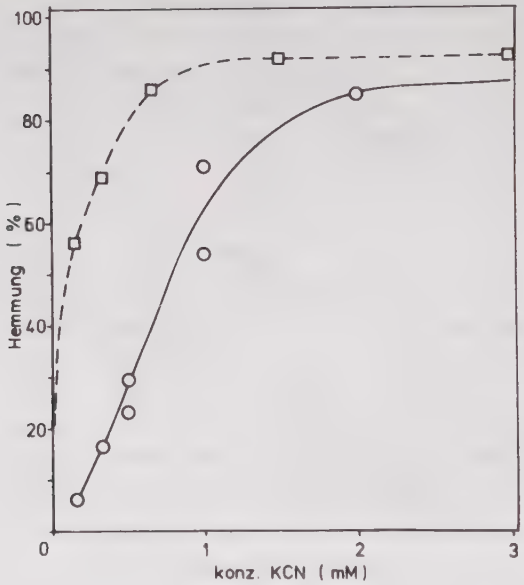


Abb. V 21: Hemmung der Succinat-Oxidase durch KCN bei pH 7,0 in der Sed.-Fraktion aus anaerob im Licht und mikroaerob im Dunkeln gewachsenen Zellen von R. fulvum.

Aktivitätsbestimmung polarographisch. Reaktionsansatz: PO_4-Puffer 100 mM pH 7,0; 30° C; Succinat 20 mM; Sed-(an-L) mit 5,2 mg Prot. und mae-D mit 5,5 mg Prot.; aqua dest. ad 2,5 ml; KCN nach Angabe.
Der Reaktionsansatz wurde vor Reaktionsbeginn (durch Zugabe des Succinat) 5 min mit dem KCN inkubiert.

-○- = mae-D --□-- = an-L

Die graphisch bestimmte KCN-Konzentration für eine 50% Hemmung war für phototrophe Zellen 0,1 mM KCN (extrapoliert) und für mikroaerobe Zellen 0,8 mM. Im Vergleich zu den Werten

für die Succinat-Oxidase von Rp. acidophila (0,026 und 0,006 mM KCN) und R. rubrum (ae-D 0,030 mM KCN, TANIGUCHI u. KAMEN, 1965) erscheint die KCN-Konzentration für 50% Hemmung bei R. fulvum sehr hoch, so daß die Endoxidase für die Übertragung von Redoxpotentialen vom Succinat auf dem Sauerstoff als relativ KCN-unempfindlich bezeichnet werden kann. Vergleichbar hohe KCN-Konzentrationen mußten zur 50%-Hemmung der NADH-Oxidase eingesetzt werden.

Vergleicht man die für eine 50% Hemmung notwendige Hemmstoff-Konzentration der übrigen Inhibitoren (Tab. V 11), so zeigt sich, daß zur Hemmung der phototrophen und der mikroaeroben Zellen durchaus unterschiedliche Konzentrationen aufgewendet werden müssen. Im Succinat-Dehydrogenase-Bereich des Succinat-Oxidase-Systems hatte einerseits Amytal eine höhere Hemmwirkung in mikroaeroben Zellen und andererseits Rotenon eine geringere, so daß hier an der Sauerstoffseite der Dehydrogenase eine Veränderung stattgefunden haben muß. Im Ubichinon-Cytochrom b-Bereich war, wie bei der NADH-Oxidase, eine erhöhte Hemmwirkung von CCCP feststellbar. Die geringere Hemmbarkeit durch HQNO an der Verbindungsstelle de Cyt.b zum Cyt.c läßt auf einen geringeren Einfluß der Cytochrome vom b-Typ im mikroaeroben Succinat-Oxidase-System schließen. Eine größere Hemmbarkeit durch TTFB im Sed. aus mikroaeroben Zellen ist deutlich (Faktor 1,5), jedoch ist der Unterschied weitaus geringer als bei Rp. acidophila (Faktor 11).

Faßt man die Befunde aus der Charakterisierung der Succinat-Oxidase phototropher und mikroaerober Zellen von R. fulvum zusammen, so ergibt sich folgendes Bild: Das pH-Optimum verändert sich mit der Änderung der Wachstumsbedingungen ebensowenig wie bei Rp. acidophila. Die unterschiedliche Arrhenius-Aktivierungsenergie läßt auf eine begrenzte temperaturbedingte Konformationsänderung schließen, wie sie von HORIO u. KAMEN (1960) im Dehydrogenase-Bereich gefunden wurde. Eine Untersuchung des DH- Bereiches mittels der Hemmwirkungen von Rotenon

Tab. V 11: Hemmung der Succinat-Oxidase-Aktivität von anaerob im Licht und mikroaerob im Dunkeln gewachsenen Zellen von R. fulvum durch spezifische Hemmstoffe der Atmungskette

Anzucht der Zellen	Hemmstoffkonz. für 50% oder *30% Hemmung (µM) an-L	mae-D
Amytal	17600	3300
CCCP	250*	110
HQNO	12	49
KCN	100	800
Rotenon	150	370
TTFB	0,14	0,10

Die Aktivitätsbestimmungen erfolgten polarographisch. Reaktionsansätze wie in Legende zur Abb. V 21. Sed.-(an-L) mit 5,2 mg Prot. und Sed.-(mae-D) mit 5,5 mg Prot. Mit Ausnahme von Amytal und KCN wurden alle Hemmstoffe in DMSO gelöst; die Vergleichswerte enthielten gleiche Mengen DMSO. (Weitere Angaben in Legende Tab. V 8).
Reaktionsansätze wurden 5 min vor Reaktionsbeginn (durch Zugabe des Succinats) mit DMSO inkubiert.

und Amytal ergab tatsächlich eine Veränderung in diesem Bereich.
In dem daran anschließenden Abschnitt der Elektronentransportkette UQ - Cyt.b und Cyt.b - Cyt.c ergab sich aus der verstärkten Hemmwirkung von CCCP und aus der geringeren von HQNO eine andere Wirkung des Cyt.b in der Übertragung von Redoxpotentialen im aeroben System. Sie könnte in einem verstärkten Elektronenfluß zum Cyt.b-Bereich und einer Verminderung

des Flusses im Cyt.c-Bereich bestehen. Die im Abschn. 4 beschriebe Cytochromanalyse ergab eine starke Abnahme von Cyt.c_2 und eine geringere von Cyt.b_{558} durch den Wechsel von anaerob-Licht auf mikroaerob-Dunkel. Da sich die Aktivitäten der Oxidase aber nur unwesentlich veränderten, erscheint eine veränderte Übertragung der Redoxäquivalente auf den Endakzeptor möglich, die auch in der stark verminderten Hemmung durch KCN zum Ausdruck kommen könnte. Wie die Cytochromanalyse weiterhin gezeigt hat, so geht die Endoxidase vom Cytochrom "o"-Typ in mikroaeroben Zellen sehr stark zurück, so daß die Übertragung zum Sauerstoff auf dem gleichen Wege wie im NADH-Oxidase-System erfolgt, wo sich die KCN-Hemmung nicht veränderte, sich in anderen Worten die Übertragung auf den "NADH-Oxidase-Weg" verlagert hatte. Eine gewisse Bestätigung hierfür könnte aus dem Befund der Lineweaver-Burk-Auftragung abgeleitet werden, die für das phototrophe Succinat-Oxidase-System zwei reaktionsbestimmende Komponenten erkennen lassen, während im mikroaeroben System nur eine Komponente sichtbar wird.

C. Tabellarische Zusammenstellung der Ergebnisse

(Tab. V 12 bis V 15; Seite 224 bis 227)

Tab. V 12: Charakteristische Werte der NADH-Oxidase in der löslichen Fraktion (Üb) von anaerob im Licht und aerob im Dunkeln kultivierten Zellen von Rp. acidophila und R. fulvum

		Rp. acidophila		R. fulvum	
		an-L	ae-D	an-L	mae-D
pH-Optimum (pH)		5,0	9,0	6,0	6,0
"K_m-Wert" bzw.	pH 8	22,0	25,0	65(*)	62(*)
(*) $K_{0.5}$-Wert für NADH (µM)	pH 5	25,0	45,4		
Temperatur-Optimum		45	40	35°C	35°C
Aktivierungsenergie E_A(kcal/Mol)		17,4	6,8	11,2	8,9

Die Zellen wurden im Fermenter unter Standardbedingungen angezogen; aerob erfolgte die Anzucht etwa im pO_2-Optimum.
Spektralphotometrische Aktivitätsbestimmung bei 340 nm in 75 mM PO_4-Puffer; 25°C; 0,2 mM NADH; Üb I mit etwa 1 mg Protein; aqua dest. ad 1,0 ml.
Die Bestimmung der K_m-Werte erfolgte bei Rp. acidophila abweichend von den angegebenen pH-Werten an-L bei pH 7,5 und ae-D bei pH 5,5. Die übrigen Bestimmungen wurden bei pH 6,0 bei R. fulvum und pH 8,0 bei Rp. acidophila durchgeführt.
Das pH-Optimum wurde bis pH 6,0 mit Citrat-Puffer, bis pH 7,5 mit PO_4-Puffer und über pH 8,0 mit $Na_2B_4O_7$-Puffer festgestellt.

Tab. V 13: Hemmung der NADH-Oxidase in der Üb I-Fraktion von anaerob im Licht und aerob im Dunkeln angezogenen Zellen von Rp. acidophila und R. fulvum

Hemmstoff	Hemmstoffkonz. (mM) für 50% Hemmung			
	Rp. acidophila		R. fulvum*	
	an-L	ae-D	an-L	mae-D
KCN	81,0	22,0	5,2	5,3
HQNO	0,4	3,0	0,109	0,007
Amytal	10,0	26,0	1,90	1,20
CCCP	0,24	0,28	0,09	0,08

Die Aktivitätsbestimmung erfolgte spektralphotometrisch oder polarographisch. CCCP und HQNO wurden in DMSO gelöst, Amytyl in PO_4-Puffer und KCN in aqua dest. Weitere Angaben in Tab. V8 und Tab. V10, aus welchen die Werte entnommen sind.

Tab. V 14: Charakteristische Werte der Succinat-Oxidase in der partikulären Fraktion (Sed.) von anaerob im Licht und aerob im Dunkeln kultivierten Zellen von Rp. acidophila und R. fulvum

	Rp. acidophila		R. fulvum	
	an-L	ae-D	an-L	mae-D
pH-Optimum (pH)	7,0	7,0	8,0	8,0
"K_m-Wert"	173	91 (454)	500 (1170)	500
Temperatur-Optimum	35°C	35-40°C	40°C	40°C
Aktivierungsenergie E_A (kcal/Mol)	11,0	7,3	20,4	15,6

Die Zellen wurden im Fermenter unter Standardbedingungen angezogen; aerob erfolgte die Kultur etwa im pO_2-Optimum.
Polarographische Aktivitätsbestimmung in 50 mM PO_4-Puffer; pH 7,0 bei Rp. acidophila und pH 7,5 bei R. molischianum; 30°C; 10 mM Succinat; Sed. mit 2-3 mg Protein; aqua dest. ad 3,0 ml. Das pH-Optimum wurde bis pH 7,5 mit PO_4-Puffer und über pH 7,5 mit $Na_2B_4O_7$-Puffer festgestellt.
( ) = K_m-Wert im Bereich hoher Substratkonzentration

Tab. V15: Hemmung der Succinat-Oxidase der partikulären (Sed.) Fraktion von anaerob im Licht und aerob im Dunkeln kultivierten Zellen von Rp. acidophila und R. fulvum

Hemmstoff	Hemmstoffkonz. (µM) für 50% Hemmung			
	Rp. acidophila		R. fulvum	
	an-L	ae-D	an-L	mae-D
KCN	26,0	0,6	100	800
TTFB	1600,0	150,0	0,14	0,10
CCCP	75,0	6,0	250*	110*

Die Werte wurden auf vergleichbare Proteinmengen bezogen

Die Zellen wurden unter Standardbedingungen im Fermenter angezogen, aerob im Dunkeln etwa im pO_2-Optimum.
Die Aktivitäten der Succinat-Oxidase wurden polarographisch bestimmt (vgl. S. 31).
KCN wurde täglich erneut in aqua dest. angesetzt. Die Versuche wurden bei pH 7,0 durchgeführt.

TTFB und CCCP wurden in DMSO gelöst; den Vergleichsansätzen wurden gleiche Mengen DMSO zugesetzt.
Die Versuchsansätze enthielten Sediment mit etwa 4-8 mg Prot. sie wurden vor Reaktionsbeginn 5 min mit dem Hemmstoff bzw. DMSO inkubiert. Reaktionsbeginn durch Zugabe des Succinats.

* Hemmstoffkonzentration für 20% Hemmung

4. Identifizierung und Lokalisation der Cytochrome

Die Cytochrome sind Hämverbindungen, die im reduzierten Zustand drei Absorpstionsbanden im sichtbaren Bereich aufweisen, welche beginnend bei der langwelligsten Bande als α-, β- und γ-Banden bezeichnet werden, wobei die γ-Bande auch Soret-Bande genannt wird. Eine vollständige Erfassung der Absorptionseigenschaften eines Cytochroms erfordert die Aufnahme eines Spektrums im oxidierten und im reduzierten Zustand und die Aufnahme eines Differenzspektrums, bei welchem die Banden des oxidierten Cytochroms von denen des reduzierten Cytochroms subtrahiert werden.
Einwandfreie Absorptionsspektren der oxidierten und reduzierten Cytochrome können nur aufgenommen werden, wenn keine weiteren absorbierenden Stoffe in der Meßlösung durch die Oxidations- und Reduktionsmittel oxidiert oder reduziert werden. Da aber zellfreie Extrakte häufig noch Zellbestandteile enthalten, welche durch das Oxidationsmittel Ferricyanid oder durch Reduktionsmittel wie Dithionit oxidiert bzw. reduziert werden, sind solche Absorptionsspektren nur mit mehr oder weniger "gereinigten" Zellextrakten durchführbar. Eine solche Reinigung war hier nicht möglich, so daß die Identifikation der Cytochrome durch die Aufnahme von Differenzspektren in den hier verwendeten Zellfraktionen erfolgte.
Besonders schwierig gestaltete sich die Bestimmung der Cytochrome in der vesikulären Memfranfraktion (Sed.) phototropher oder mikroaerober Zellen, wo das Bacteriochlorophyll und die Carotinoide stark oxidiert bzw. reduziert wurden, so daß die Absorptionsbanden der Photopigmente die α- und β-Banden der Cytochrome kaum erkennen ließen. Eine Bestimmung gelang dennoch dadurch, daß Bchl. und Carotinoide einen längeren Zeitraum zur völligen Reduktion benötigten als die Cytochrome, so daß diese bei sofortiger Messung nach Zugabe des Reduktionsmittels erkannt werden konnten. Die Carotinoide in den Zellextrakten befanden sich weitgehend im reduzierten Zustand, was dann beim Zusatz von Ferricyanid zur sofortigen Oxidation

führte. Daher konnte in solchen Zellextrakten kein Oxidationsmittel eingesetzt werden, so daß der schon in den Zellextrakten im reduzierten Zustand befindliche Anteil der Cytochrome nicht erfaßt werden konnte. Die Cytochrome vom c-Typ lagen in den Zellextrakten zu etwa 50% in reduzierter Form vor.

Zur quantitativen Bestimmung der Cytochrome vom c- und b-Typ in den Sed.-Fraktionen wurden die Carotinoide und Bacteriochlorophylle extrahiert. Aus dem so behandelten Zellmaterial wurden die Cytochrome mit nicht kovalent gebundenen Hämgruppen (Cyt.a, Cyt.b) durch saure Acetonlösung extrahiert; das verbleibende Zellmaterial enthielt die Cytochrome mit den kovalent gebundenen Hämgruppen (Cytochrome vom c-Typ). Beide Fraktionen wurden dann in alkalischer Pyridinlösung aufgenommen und die Pyridinhämochrome im Differenzspektrum bestimmt.

Die qualitative Bestimmung der Cytochrome vom b- und c-Typ erfolgt anhand der Lage ihrer α-Banden, die beim gleichzeitigen Auftreten mehrerer Cytochrome erst im Tieftemperaturspektrum bei 77^{o} K festgestellt werden können (BARTSCH, 1968). Ein weiteres Bestimmungsmerkmal dieser Cytochrome stellt das Redoxpotential, welches jedoch mangels geeigneter Geräte nicht ermittelt werden konnte. Auch die Bestimmung der Cytochrome vom b- und c-Typ mittels Tieftemperaturspektren mit einem Shimadzu-Spektralphotometer war nicht möglich, da die Bchl. und Carotinoide in der Meßlösung einen Abgleich der Basislinie unmöglich machten.

Eine wenn auch ungenügende Differenzierung der Cytochrome war dadurch möglich, daß Reduktionsmittel unterschiedlichen Redoxpotentials eingesetzt wurden (Ascorbat, Ferrocyanid, NADH und Succinat). Weiterhin gelang eine verbesserte Differenzierung durch Abkühlen der Küvetten und Meßlösungen auf $0\,^{o}$C.

In der Üb-Fraktion von Rp. acidophila, R. fulvum und R. molischianum konnten nur Cytochrome vom c-Typ nachgewiesen werden und solche, die CO-Bindungen eingingen.

Lösliche Cytochrome vom c-Typ und solche, die auch eine CO-

Bindung aufwiesen, wurden auch von WESTON u. KNOWLES (1973, 1974) in Beneckea natriegens bestimmt. Das lösliche Cytochrom im Üb I der aeroben und phototrophen Zellen von Rp. acidophila war in Aceton-HCl unlöslich. Im Differenzspektrum bei Raumtemperatur und Dithionit oder NADH als Reduktionsmittel lagen die Absorptionsmaxima bei 551, 522 und 418 nm, die Minima bei 566, 536 und 450 nm. Bei 0° C trat eine Verschiebung der Maxima zum kurzwelligen Bereich um 1 nm auf. Das Pyridinhämochrom hatte im Differenzspektrum Absorptionsmaxima bei 549, 518 und 414 nm; es konnte damit eindeutig als Cytochrom vom c-Typ identifiziert werden und wird im folgenden als Cyt.c_{551} bezeichnet. In der partikulären Fraktion konnte es nicht nachgewiesen werden (Tab. V 16).

Das Cytochrom im Üb I von Rp. acidophila (an-L und ae-D), welches im reduzierten Zustand CO binden konnte, zeigte im CO-Differenzspektrum (Abb. V 22) α-, β - und γ -Banden bei 564, 536 und 415 nm; die Absorptionsminima lagen bei 550, 522 und 424 nm. Cytochrome vom o-Typ (o = Oxidase) haben im CO-Differenzspektrum α-, β - und γ-Banden bei 565-570, 535 und 416-418 nm (BARTSCH, 1968) und sind membrangebunden. Das CO-bindende Cytochrom von Rp. acidophila war dagegen löslich und die Lage der α - und Soret-Banden niedriger. Das CO-bindende Cytochrom in Beneckea natriegens (WESTON u. KNOWLES, 1973) hatte ebenfalls zum kürzeren Wellenlängenbereich verschobene α- und γ-Banden. Es trat nur in der löslichen Fraktion auf, und die Absorptionsbanden erreichten erst nach 30-45 min Kohlenmonoxyd-Inkubation ihr Maximum im Gegensatz zu o-Typ Cytochromen, die sehr kurze CO-Inkubationszeiten benötigten. Auch das CO-bindende Cytochrom von Rp. acidophila benötigte 45 min CO-Inkubation zur vollen Ausbildung der Absorptionsbanden. Die CO-Bindung wurde durch Tageslicht aufgehoben.

Aufgrund der Absorptionseigenschaften, der Löslichkeit und aufgrund des Befundes, daß die Häme kovalent gebunden sind, kann dieses CO-bindende Cytochrom nur dem c-Typ zugeordnet werden. Es wird im folgenden als Cyt.$c_{550(CO)}$ bezeichnet.

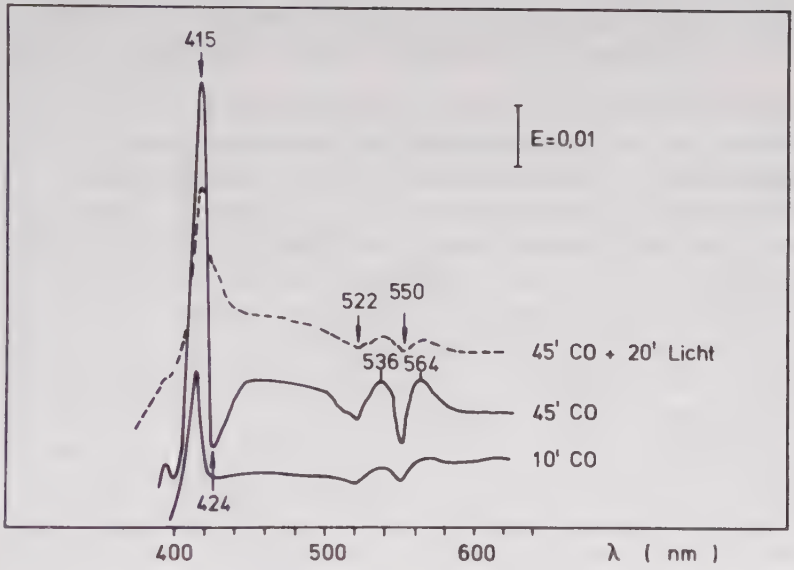


Abb. V 22: Kohlenmonoxyd-Differenzspektrum der löslichen Fraktion (Üb) aus anaerob im Licht kultivierten Zellen von Rp. acidophila St. 7050.

Spektrum: Dithionit reduziert + CO minus Dithionit reduziert (Raumtemperatur).
Die Proben wurden 3 min mit Argon durchströmt, dann mit einigen Körnern Dithionit reduziert und in der abgedunkelten Meßküvette mit CO begast. Sämtliche Gase waren wasserdampfgesättigt.
Gestrichelte Linie: Beide Küvetten wurden 20 min dem Tageslicht ausgesetzt. Proteingehalt der Üb-Fraktion = 5,16 mg/ml.
Ausgezogene Linien: Inkubationszeiten mit CO im Dunkeln.

Tab. V 16: Cytochromgehalt der partikulären (Sed.) und löslichen Fraktion (Üb) anaerob im Licht und aerob im Dunkeln kultivierter Zellen von Rp. acidophila.

Cytochrome	Cytochromgehalte in nmole/mg Prot. anaerob-Licht		aerob-Dunkel	
	Sed.	Üb	Sed.	Üb
Cyt.c $_{551}$	-	1,169	-	1,010
Cyt.c $_{554}$	2,107	-	0,742	-
Cyt.b $_{560-561}$	Spuren	-	0,571	-
Cyt.c $_{551\ (CO)}$	-	0,099	-	0,036
Cyt.c? $_{558\ (CO)}$	-	-	0,225	-
Cyt.b $_{562\ (CO)}$	geringe Mengen	-	0,123	-

Die Anzucht der Zellen erfolgte im Fermenter unter Standardbedingungen (Kap. II 3), die Anzucht aerob im Dunkeln erfolgte bei pO_2 150 Torr.
Die Bestimmung der Cytochrome vom c- und b-Typ erfolgte durch Pyridinhaemochrom-Differenzspektren nach Aceton-HCl-Fällung und Redox-Differenzspektren, beide jeweils Dithionit reduziert minus Luft bzw. Ferricyanid oxidiert, oder mit Redox-Differenzspektren Dith. reduziert minus Luft bzw. Ferricyanid oxidiert (s. Text). εmM der α-Banden für Cyt.c = 20,1 und Cyt.b = 25,6 (BERDEN u. SLATER, 1970)

Die Cytochromoxydasen wurden im Kohlenmonoxyd-Differenzspektrum, Dithionit reduziert + CO minus Dithionit reduziert, bestimmt. εmM der γ-Bande = 68,0 (WESTON u. KNOWLES, 1974).
- = Cytochrome nicht nachweisbar.

Lösliche Cytochrome vom c-Typ mit der Fähigkeit, CO-Bindungen einzugehen, sind bisher noch nicht bei Rhodospirillaceae aber bei Chromatium St. D beschrieben worden (zit. in WESTON u. KNOWLES, 1974).

Da Cyt. $c_{550(CO)}$ im reduzierten Zustand Kohlenmonoxyd bindet, sollte es auch eine Bindung mit Sauerstoff eingehen können; es kann völlig durch NADH reduziert werden und kommt zusammen mit Cyt.c_{551} im Üb I vor, in welchem nur die NADH-Oxidase aktiv ist. Daraus kann geschlossen werden, daß es die Endoxidase des NADH-Oxidase-Systems darstellt. Der Cyt.$c_{550(CO)}$-Gehalt war in aeroben Zellen von Rp. acidophila bedeutend geringer als in phototrophen Zellen (Tab. V 16); in den letzteren wurden nur geringe Mengen von Cyt.$b_{562(CO)}$ (s. u.) festgestellt, so daß Cyt.$c_{550(CO)}$ vermutlich die wichtigste Endoxidase im oxidativen ETS der phototrophen Zellen darstellt.

In der Sed.-Fraktion von Rp. acidophila wurden zwei CO-bindende Cytochrome identifiziert: Cyt.$b_{562(CO)}$ (Abb. V 23) mit α-, β- und γ-Banden (Kohlenmonoxyd-Differenzspektrum) bei 572, 540 und 417 nm und Minima bei 562 und 434 nm, sowie ein Cyt.$c_{558(CO)}$ mit entsprechenden Maxima bei 570, 538 und 414 und Minima bei 558 und 432 nm. Die Spektren erlauben keine sichere Festlegung des Cytochrom-Charakters. Die kurzwellige Soret-Bande spricht jedoch für Cyt.c, weshalb vorläufig die Bezeichnung Cyt.c?$_{558(CO)}$ gewählt wird.

Die Cytochrome c_{554} und $b_{560-561}$ wurden aufgrund der Bindung ihrer Hämgruppen (Aceton-HCl-Löslichkeit) und ihrer α-Banden identifiziert. In Abb. V 23 sind Absorptionsbanden des Cyt.c_{554} sichtbar, welche die des Cyt.$b_{560-561}$ überdecken. Die Banden des Cyt.b traten jedoch in Erscheinung, wenn Succinat oder NADH als Reduktionsmittel verwendet wurde: Diese bewirkten eine langsame Reduktion des Cyt.c_{554}, wobei die Banden des Cyt.$b_{560-561}$ als Schultern der sich ausbildenden Absorptionsmaxima auftraten. Es kann daher angenommen werden, daß Cyt.$b_{560-561}$ in den Extrakten in völlig reduziertem Zustand vorliegt.

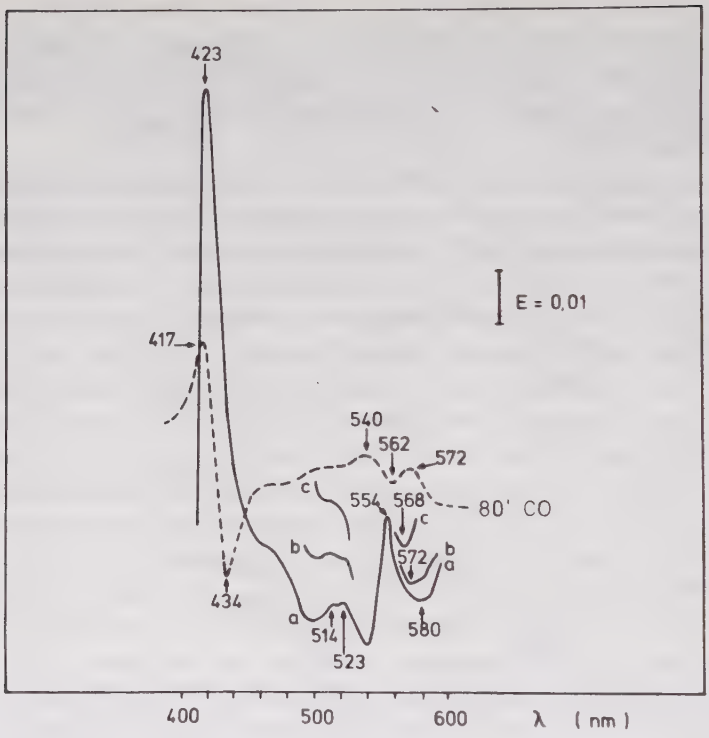


Abb. V 23: Redox-Differenzspektrum und Kohlenmonoxyd-Differenzspektrum der partikulären Fraktion (Sed.) aus anaerob im Licht kultivierten Zellen von Rp. acidophila (Temperatur 0° C).

Ausgezogene Linie: Spektrum Dithionit reduziert minus Luft oxidiert. Kurve a: nach 1 min. Kurve b: nach 17 min. Kurve c: nach 100 min.
Gestrichelte Linie: Spektrum Dithionit reduziert + CO minus Dithionit reduziert. Die Proben wurden 3 min mit Argon durchströmt, mit einigen Körnern Dithionit reduziert und dann in der abgedunkelten Meßküvette 1 min mit CO durchströmt; nach 80 min Inkubationszeit im Dunkeln wurde das Spektrum aufgenommen.

In der löslichen Fraktion von R. molischianum und R. fulvum wurden ebenfalls Cytochrome vom c-Typ nachgewiesen (Abb. V 24); sie enthielt auch ein CO-bindendes Cytochrom mit sehr kurzwelliger Soret-Bande, zu dem möglicherweise auch das Absorptionsmaximum von 560 nm im Redox-Differenzspektrum gehört.
In der partikulären Fraktion von R. molischianum und R. fulvum wurden Cytochrome vom c- und b-Typ gefunden (Abb. V 25).
Die CO-bindenden Cytochrome konnten dem o-Typ zugeordnet werden. Das Cyt. "o" von R. molischianum hatte α-, β- und γ-Banden bei 574, 535 und 416 nm und das von R. fulvum bei 575, 535 und 416 nm. Die Cytochrom "o"-Gehalte beider Bakterienarten verringerten sich sehr stark bei mikroaerobem Wachstum (Tab. V 17). Dies könnte allerdings auch daran liegen, daß das pO_2-Optimum beim mikroaeroben Wachstum der zur Cytochromanalyse verwendeten Zellen gelegentlich überschritten wurde, so daß das ETS u. U. bereits geschädigt war. Die Abnahme war bei R. fulvum geringer, was in Zusammenhang mit seiner höheren Sauerstofftoleranz gebracht werden kann.
Die Änderung der Wachstumsbedingungen von anaerob-Licht auf mikroaerob-Dunkel hatte auch eine Abnahme des Cytochrom-b- und c-Gehaltes zur Folge. Die Abnahme des Cyt.b_{558} und des Cyt.c_2 war bei R. molischianum stärker als bei R. fulvum. Auffallend ist die Veränderung des Cyt.b/Cyt.c-Verhältnisses zugunsten des Cyt.b, die jedoch bei weitem nicht so groß war wie bei Rp. acidophila.

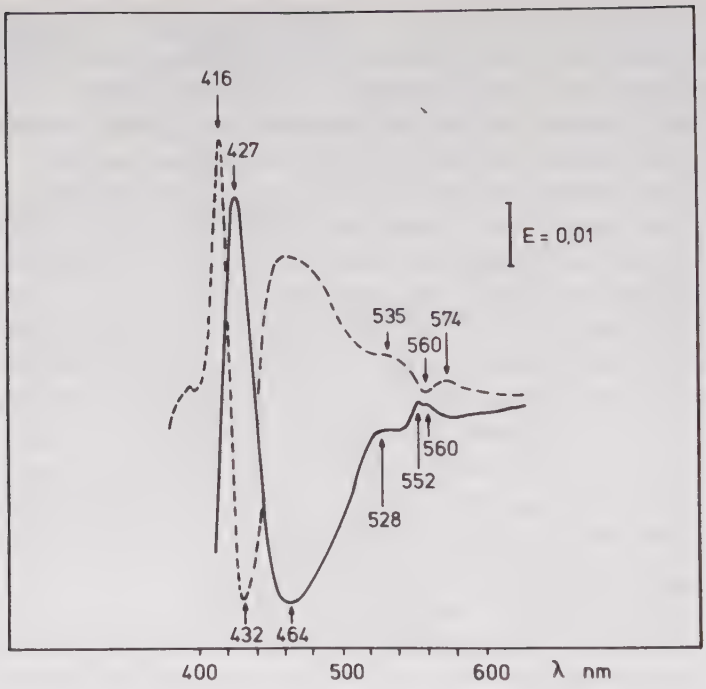


Abb. V 24: Redox-Differenzspektrum und Kohlenmonoxyd-Differenzspektrum der löslichen Fraktion (Üb) aus mikroaerob im Dunkeln kultivierten Zellen von R. molischianum St. N 131 (Raumtemperatur).

Ausgezogene Kurve: Spektrum Dithionit reduziert minus Luft oxidiert. 1 min Inkubationszeit.
Gestrichelte Kurve: Spektrum Dithionit reduziert + CO minus Dithionit reduziert. Die Proben wurden 3 min mit Argon durchströmt, mit einigen Körnern Dithionit reduziert und dann in der abgedunkelten Meßküvette 1 min mit CO durchströmt; nach 10 min Inkubationszeit im Dunkeln wurde das Spektrum aufgenommen.
Proteingehalt der Üb-Fraktion = 3,12 mg/ml.

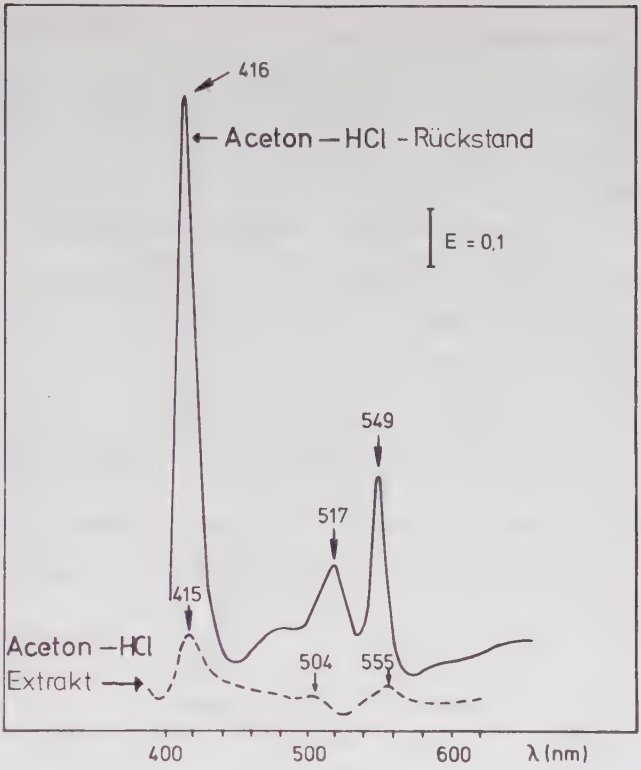


Abb. V 25: Pyridinhaemochrom-Differenzspektrum der partikulären Fraktion (Sed.) nach Aceton-HCl-Extraktion, aus anaerob im Licht kultivierten Zellen von R. molischianum St. N 131.

Spektrum: Dithionit reduziert minus Luft oxidiert (Raumtemperatur).
Eingesetzte Proteinmenge 30,5 mg. Extraktionsmethode s. Kap. II 4. Der Extrakt wurde mit 2 ml und der Rückstand mit 4 ml Pyridin-NaOH versetzt.

Tab.V 17: Cytochromgehalt der partikulären Fraktion (Sed.) anaerob im Licht und mikroaerob im Dunkeln kultivierter Zellen von R. molischianum und R. fulvum.

Cytochrome	R. f u l v u m anaerob-Licht nmole/mg Prot.	mikroaerob-Dunkel nmole/mg Prot.
Cyt.c_2 (549)	1,196	0,342
Cyt.b_{558}	0,447	0,230
Cyt. "o"	1,336	geringe Mengen

Cytochrome	R. m o l i s c h i a n u m anaerob-Licht nmole/mg Prot.	mikroaerob-Dunkel nmole/mg Prot.
Cyt.c_2 (552)	1,514	0,125
Cyt.b_{558}	0,414	0,052
Cyt. "o"	0,853	Spuren

Die Anzucht der Zellen erfolgte im Fermenter unter Standardbedingungen (Kap. II 3); mikroaerob im Dunkeln überstieg der pO_2 mehrmals das pO_2-Optimum (Kap. IV D 2).
Cytochrombestimmung:
Cyt.c u. Cyt.b: Pyridinhaemochrom-Differenzspektrum Dithionit reduziert minus Luft oxidiert des Aceton-HCl unlöslichen Rückstandes bzw. des HCl-löslichen Extraktes. εmM der α-Banden für Cyt.c = 20,1 und Cyt.b = 25,6 (BERDEN u. SLATER, 1970).

Cyt. "o": Kohlenmonoxyd-Differenzspektrum Dithionit reduziert + CO minus Dithionit reduziert. εmM der γ-Bande für Cyt. "o" = 68,0 (WESTON u. KNOWLES, 1974).

VI DISKUSSION

Die Regulation der Bacteriochlorophyllsynthese und die Kinetik des Wachstums wurde bereits in Kap. IV D diskutiert. Hier sollen überwiegend Aspekte des Elektronentransports und der Energiegewinnung während des mikroaeroben Wachstums der braunen Rhodospirillen behandelt werden.

Obwohl die meisten Arten der Rhodospirillaceae fakultativ aerob sind, galten einige Arten bisher als obligat anaerob und phototroph. Die am längsten bekannte Gruppe der anaeroben Arten sind die braunen Rhodospirillen. Noch van NIEL (1944) und GIESBERGER (1947) betonten die Notwendigkeit des absoluten Sauerstoffabschlusses für ihre Kultur, obwohl GIESBERGER mit Verwunderung vermerkt, daß sie leicht aus Oberflächenwasser isoliert werden können. SISTROM (1965) zeigte dann, daß Rhodospirillum molischianum keineswegs extrem sauerstoffempfindlich ist, da im Licht und bei vermindertem Sauerstoffpartialdruck das Wachstum zumindest in der ersten Zeit nach Einsetzen der Belüftung nicht gehemmt war. Im Dunkeln konnte er bei gleicher Belüftung kein Wachstum feststellen, obwohl die Zellen in Kurzzeitversuchen Sauerstoff aufnahmen. Da während des aeroben Wachstums kein Bacteriochlorophyll synthetisiert wurde, kam er zu dem Schluß, daß unter diesen Bedingungen nur eine photosynthetische Energiegewinnung stattgefunden haben konnte.

Daß braune Rhodospirillen unter aeroben Bedingungen nicht nur photosynthetisch, sondern auch durch Atmung wachsen können, demonstrierte PFENNIG (1970) in Agar-Hochschichtkulturen, in denen sich mikroaerobe Wachstumszonen bildeten. (Der Vollständigkeit halber sei erwähnt, daß bereits MOLISCH 1907 in seiner Beschreibung von R. photometricum die Art als "mikroaerophil" bezeichnete). Da die Zellen in den Wachstumszonen der Agarhochschichtkulturen voll pigmentiert waren, postulierte PFENNIG, daß ein Teil des photosynthetischen Elektronentrans-

portsystems der oxidativen Energiegewinnung dienen kann. Das Unvermögen, unter voll aeroben Bedingungen zu wachsen, würde dann darauf beruhen, daß die Neubildung des photosynthetischen Apparates wie bei allen Rhodospirillaceae oberhalb eines bestimmten Sauerstoffpartialdruckes gehemmt wird. In diesem Fall müßten Zellen, die anaerob im Licht gewachsen sind und deshalb ein voll ausgebildetes Pigmentsystem besitzen, auch bei hohem pO_2 eine Zeitlang im Dunkeln wachsen können, bis der photosynthetische Apparat ausverdünnt ist. Die Wachstumsversuche im Fermenter zeigten, daß dies nicht der Fall ist. Das Wachstum hörte sofort auf, wenn Kulturen, die unter anaeroben Bedingungen im Licht gewachsen waren, stark belüftet wurden. Man wird also sagen können, daß die Hemmung durch Sauerstoff nicht unmittelbar mit dem Vorhandensein eines photosynthetischen Systems zur Energiegewinnung zusammenhängt.

Charakteristisch für die Wachstumshemmung durch Sauerstoff ist der schlagartige Stillstand des Wachstums im Moment des vollen Luftzutritts. Umgekehrt setzte das Wachstum sofort wieder ein, wenn gut wachsende Kulturen, die für kurze Zeit einem hohen pO_2 ausgesetzt waren, wieder unter Wachstumsbedingungen gebracht wurden. Eine Erklärung für dieses unvermittelte Ein- und Aussetzen des Wachstums geben die Messungen der Sauerstoffaufnahme.
Mikroaerob gewachsene Kulturen von R. molischianum, in denen der Sauerstoffpartialdruck stark erhöht wurde, zeigten unmittelbar nach der Umschaltung eine Sauerstoffaufnahme, die um ein Vielfaches höher war als während des mikroaeroben Wachstums. Bei Wiederherstellung der mikroaeroben Bedingungen ging die Sauerstoffaufnahmerate auf den Ausgangswert zurück. Stark erhöhte Atmung bei gleichzeitigem Wachstumsstillstand gilt als typisches Merkmal für die Entkopplung von Elektronentransport und Energiegewinnung. Die Wachstumshemmung durch Sauerstoff würde also in erster Linie durch das Aussetzen der oxidativen Phosphorylierung verursacht werden.

Eine gewisse Bestätigung dafür findet sich, wenn man die Verteilung der submikroskopischen ringförmigen Strukturen betrachtet, die regelmäßig in zellfreien Extrakten auftraten und etwa die Größe von Enzymproteinen aufwiesen. Diese Strukturen befanden sich bei Rp. acidophila teils an der Oberfläche von Membranvesikeln, teils in der löslichen Fraktion, während sie bei R. fulvum und R. molischianum nur ausnahmsweise an den Membranvesikeln gefunden wurden. Die Möglichkeit, daß es sich bei den Ringstrukturen um den in der jüngsten Literatur viel diskutierten Kopplungsfaktor zwischen Elektronentransportsystem und Phosphorylierung (ATPase) handelt, wurde erwogen (s. Absch. V 1 b). Wie ASANO et al. (1973) nachgewiesen haben, wird die Phorphorylierung durch Ablösung des Kopplungsfaktors von der Membran unterbrochen und wieder aufgenommen, wenn die Fraktion, die den Kopplungsfaktor enthielt, wieder mit der Membranfraktion vereinigt wurde. Die Tatsache, daß bei den beiden sauerstoffempfindlichen Arten sich die ringförmigen Strukturen im Zuge der Aufarbeitung der Extrakte an der Luft vollständig ablösen, während dies bei Rp. acidophila unter den gleichen Bedingungen nicht der Fall ist, liefert ein starkes Argument dafür, daß diese Strukturen für die Entkopplung der Energiegewinnung vom Elektronentransportsystem (ETS) verantwortlich sind. Da bei R. molischianum auch das aerobe Wachstum im Licht (unabhängig vom Bchl.-Gehalt) gehemmt wird, ist anzunehmen, daß der gleiche Mechanismus auch bei der Photophosphorylierung wirksam ist. In Zellen von R. fulvum, die aerob im Licht nicht gehemmt werden (wohl aber wegen der fehlenden Ausbildung des Photosyntheseapparates nach einiger Zeit aufhören zu wachsen), ist die Photophosphorylierung offenbar mit einem weniger sauerstoffempfindlichen Kopplungsfaktor verbunden.

Mit diesem Konzept stößt man jedoch auf Schwierigkeiten, wenn man die Kulturen betrachtet, bei denen ein pO_2 knapp oberhalb des pO_2-Optimums eingestellt war (vgl. Tab. IV 11). Hier stellte sich zunächst ein langsames Wachstum ein, das aber

nach etwa einer Generation allmählich zum Stillstand kam (in Kap. IV D als kurzfristiges Wachstum bezeichnet). Zweifellos findet auch hier noch eine begrenzte Energiegewinnung statt. Zu fragen ist jedoch, weshalb das Wachstum nicht aufrechterhalten werden kann. Die gefundene Wachstumscharakteristik läßt vermuten, daß hier ein weiterer Faktor beteiligt ist, der für das Wachstum erforderlich ist, aber nach einer gewissen Zeit seine Wirkung verliert. Der Befund, daß mit dem Auslaufen des Wachstums der Sauerstoffverbrauch stark zurückgeht, spricht sehr dafür, daß dieser Faktor eine Komponente des Elektronentransportsystems ist.

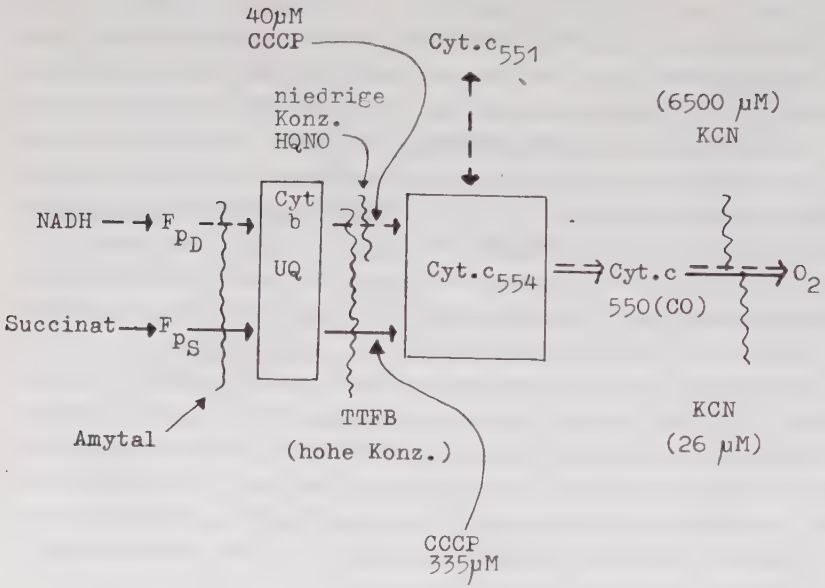
Tatsächlich zeigten die Cytochromanalysen, daß in Kulturen, die durch Sauerstoff gehemmt waren, ein Cytochrom fast vollständig fehlte, das unter phototrophen Bedingungen stets vorhanden war, nämlich die Endoxidase vom Cytochrom o-Typ. Daß die langsame Inaktivierung eines Cytochroms allgemein bei der Wachstumslimitierung der braunen Rhodospirillen durch Sauerstoff wirksam ist, zeigt die Beobachtung, daß das Wachstum nach Inkubation bei hohem pO_2 sich je nach Inkubationszeit mehr oder weniger verzögerte, wenn die Kultur wieder unter Wachstumsbedingungen gebracht wurde. In den Zellen der braunen Rhodospirillen gibt es demnach zwei Mechanismen, die das Wachstum unter aeroben Bedingungen im Dunkeln unmöglich machen; der eine ist die sofort wirksam werdende Entkopplung der Energiegewinnung vom Elektronentransport, der andere die allmähliche Inaktivierung einer Komponente des Elektronentransportsystems.

Der Mechanismus, durch den der Elektronentransport von der Energiegewinnung entkoppelt wird, kann durch Änderung des pO_2 ein- und ausgeschaltet werden. Die Inaktivierung der Endoxidase ist irreversibel; das Cytochrom muß beim Wiedereintreten von Wachstumsbedingungen neu gebildet werden. Beide Mechanismen werden für die Betrachtung des mikroaeroben Wachstums, welches nun diskutiert werden soll, noch eine Rolle spielen.

Der pO_2-Bereich für das mikroaerobe Wachstum, in dem die braunen Rhodospirillen zu wachsen vermögen, ist bei den drei Arten verschieden. Was sie jedoch gemeinsam von den fakultativ aeroben Arten unterscheidet, ist, daß das Wachstum im Dunkeln nur möglich ist, wenn das photosynthetische Membransystem gebildet werden kann. In vielen anderen physiologischen Eigenschaften bestehen jedoch zwischen den beiden Gruppen allenfalls graduelle Unterschiede. Besonders wichtig für die Beurteilung des aeroben Wachstums beider Gruppen ist das Verhalten von Kulturen, die nach phototrophem Wachstum belüftet und verdunkelt werden. Sowohl bei Rp. acidophila als auch bei den braunen Rhodospirillen (sofern ein zuträglicher pO_2 eingestellt wurde) setzte sich das Wachstum unverzögert fort, bei den braunen Rhodospirillen jedoch mit wesentlich verminderter Geschwindigkeit. Beide Gruppen müssen also über ein oxidatives System zur Energiegewinnung verfügen, das auch unter phototrophen Bedingungen gebildet wird und nach Zutritt von Sauerstoff sofort aktiv werden kann.

Die oxidativen Elektronentransportsysteme anaerob im Licht gewachsener brauner Rhodospirillen und von Rp. acidophila stimmen in wesentlichen Merkmalen überein. Die Enzymaktivitäten der NADH-, Succinat- und Cytochrom c-Oxidase des Rohextraktes konnten zu einem großen Teil im gewaschenen Sediment wiedergefunden werden, d. h. sie sind mehr oder weniger fest an die photosynthetischen Membranen gebunden.
Die Endoxidase ist in phototroph gewachsenen Zellen beider Gruppen vom o-Typ; andere Endoxidasen waren nicht nachweisbar. SASAKI et al. (1970) fanden, daß Rp. sphaeroides nach phototrophem Wachstum ebenfalls nur ein Cytochrom vom o-Typ enthielt. In allen diesen Arten ist also in phototroph gewachsenen Zellen ein oxidatives ETS ausgebildet, das mit dem intracytoplasmatischen Membransystem verbunden ist und im folgenden als oxidatives intracytoplasmatisches ETS oder ETS I bezeichnet wird (Schema V 3).

Wenn anaerob im Licht gewachsene Zellen von Rp. acidophila



Schema V 3: Hypothetisches Elektronentransportschema des ETSI anaerob im Licht kultivierter Zellen von Rp. acidophila.

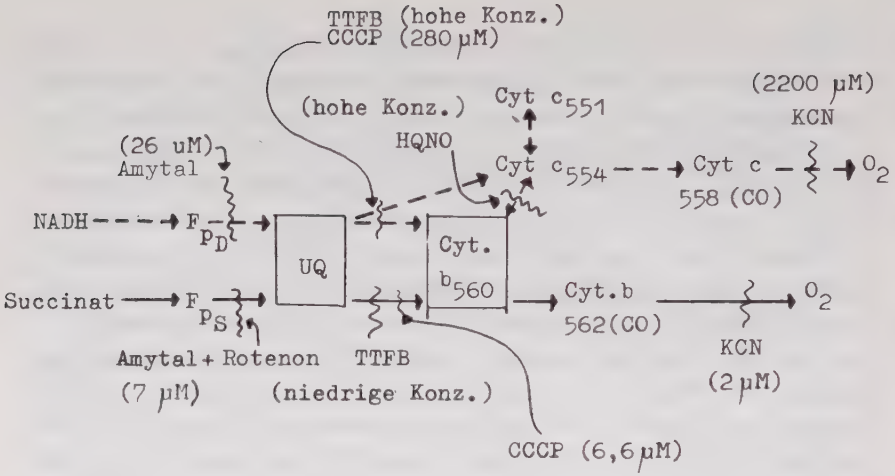
Hemmstoffkonzentrationen für 50% Hemmung.

——= Succinat-Oxidase-System

– – –= NADH-Oxidase-System

längere Zeit bei hohem pO_2 im Dunkeln gewachsen sind, so stellen sich mit dem Verschwinden des intracytoplasmatischen Membransystems charakteristische Veränderungen im ETS ein. Das Cytochrom vom o-Typ (Cyt. $c_{550(CO)}$ in Tab. V 8) nimmt stark ab, während gleichzeitig als neue Endoxidasen die Cytochrome $c_{558(CO)}$ und Cyt. $b_{562(CO)}$ in Erscheinung treten. Außerdem verringert sich der Gehalt an Cyt.c_{554}; Cyt.$b_{560-561}$ nimmt stark zu. Die spezifischen Aktivitäten aller untersuchten Enzyme steigen, verglichen mit den Aktivitäten phototropher Zellen, auf etwa das Doppelte an, die Cytochrom c-Oxidase sogar auf das Fünffache. Damit hat sich unter voll aeroben Bedingungen ein neues ETS gebildet, welches das oxidative ETS phototropher Zellen weitgehend ersetzt. Das neugebildete ETS wird im folgenden als oxidatives cytoplasmamembran-gebundenes ETS oder ETS II bezeichnet.

Die einzelnen Komponenten des ETS II, die in der Cytoplasmamembran lokalisiert sein müssen, haben nun auch verschiedene Eigenschaften. So fand sich z. B. die Aktivität der Succinat-Oxidase des Rohextraktes aerober Zellen nur zu 40% in der Membranfraktion (Sediment) wieder, während dieser Anteil in phototrophen Zellen sich auf 80% belief. Man kann daraus schließen, daß eine oder mehrere Komponenten des Succinat-Oxidase-Systems sich von der Cytoplasmamembran abgelöst haben, was bei der Succinat-Oxidase des ETS I am intracytoplasmatischen Membransystem im weitaus geringeren Maße der Fall ist. Wie die Charakterisierung der NADH- und der Succinat-Oxidase ergeben hat, handelt es sich in den beiden Elektronentransportsystemen um verschiedene Enzymsysteme. NADH- und Succinat-Oxidase aus phototroph gewachsenen Zellen haben eine andere Substrataffinität und Aktivierungsenergie (E_A) als die entsprechenden Enzyme aus aerob gewachsenen Zellen. Die NADH-Oxidasen anaerob-phototropher und aerob-chemotropher Zellen unterscheiden sich sogar im pH-Optimum. Diese Befunde, die Cytochrom-Analysen und die Versuche mit spezifischen Atmungsketten-Inhibitoren führen zu der Vorstellung, daß sich



Schema V 4: Hypothetisches Elektronentransportschema des ETS II aerob im Dunkeln kultivierter Zellen von Rp. acidophila.

Hemmstoffkonzentrationen für 50% Hemmung.

——— = Succinat-Oxidase-System

– – – = NADH-Oxidase-System

die Elektronentransportkette am Ubichinon-Cytochrom-b-Komplex verzweigt (vgl. Schema V 4). Eine Verzweigung im ETS aerober Zellen wird auch von THORE et al. (1969) für R. rubrum und von BACCARINI-MELANDRI et al. (1973) für Rp. capsulata postuliert.
Das Vorkommen zweier oxidativer ETS ist nicht auf Rp. acidophila beschränkt, sondern wurde auch bei allen anderen daraufhin untersuchten fakultativ aeroben Rhodospirillaceae nachgewiesen (TANIGUCHI u. KAMEN, 1965; YAMASHITA et al., 1967; THORE et al., 1969; SASAKI et al., 1970; KLEMME u. SCHLEGEL, 1969; BACCARINI-MELANDRI et al., 1973).
Eine besonders aufschlußreiche Untersuchung der Vorgänge, die sich beim Übergang vom ETS I der anaerob-phototroph gewachsenen Zellen auf das ETS II der aerob gewachsenen abspielen, liefern KEISTER u. MINTON (1969). Die Autoren ließen phototroph gewachsene Zellen von R. rubrum aerob weiterwachsen und bestimmten nach jeder Generation die Aktivitäten verschiedener Enzyme des ETS. Sowohl die spezifische Aktivität der Succinat-Cytochrom-c-Reduktase, wie auch die der Succinat-Dehydrogenase stiegen in der ersten Generation an; sie verringerten sich in der zweiten Generation und stiegen dann in der dritten Generation noch einmal wieder an.
Die Befunde an Rp. acidophila und den braunen Rhodospirillen machen es wahrscheinlich, daß zunächst die Enzymaktivitäten im ETS I verstärkt werden, das ETS I dann aber infolge der längeren Einwirkung des Sauerstoffs auf die Endoxidase inaktiviert wird, ohne daß das ETS II schon voll ausgebildet ist (2. Generation). Erst in der dritten oder vierten Generation ist bei Rp. sphaeroides die Entwicklung des ETS II abgeschlossen.

Wir kommen nun auf das mikroaerobe Wachstum der braunen Rhodospirillen zurück. Das auffallendste Merkmal der mikroaerob gewachsenen Zellen ist, daß sie wie die anaerob-phototroph gewachsenen Zellen ein voll ausgebildetes Membransystem besitzen. Es wäre zu erwarten, daß die mikroaeroben Zellen das

gleiche oxidative ETS enthalten wie die phototrophen Zellen. Vergleicht man nun die Eigenschaften des NADH- und Succinat-Oxidase-Systems anaerob im Licht und mikroaerob im Dunkeln kultivierter Zellen von R. fulvum, so findet man tatsächlich eine fast vollständige Übereinstimmung im pH-Optimum, in der Aktivierungsenergie sowie in der Substrataffinität (vgl.Tab.V 12 u. V 14). Das Verhalten der NADH-Oxidase gegenüber spezifischen Hemmstoffen ist im wesentlichen gleichartig. Obwohl damit feststeht, daß es sich in den phototrophen und mikroaeroben Zellen um die gleichen Enzyme handelt, bestehen doch Unterschiede in ihren Leistungen. So war die spezifische Aktivität der Succinat-Oxidase in den Membranen mikroaerober Zelzel von R. molischianum und R. fulvum sowie die NADH-Oxidase bei R. fulvum deutlich höher als in den Membranen phototropher Zellen. Die Aktivität der Cytochrom c-Oxidase hatte sich in den Membranen mikroaerober Zellen von R. molischianum gegenüber denen phototropher Zellen sogar auf das Doppelte erhöht. Die Zusammensetzung der Cytochrome war unter mikroaeroben Bedingungen ebenfalls etwas anders als anaerob im Licht, was auch in einer verminderten Hemmbarkeit der Succinat-Oxidase mikroaerob gewachsener Zellen durch KCN zum Ausdruck kam. Das ETS der braunen Rhodospirillen ist also in der Lage, eine gewisse Anpassung an die mikroaeroben Verhältnisse zu vollziehen.

Man sollte erwarten, daß eine höhere spezifische Enzymaktivität auch in einer höheren Wachstumsgeschwindigkeit zum Ausdruck kommt. Es ist jedoch zu berücksichtigen, daß die gemessenen Aktivitäten sich auf das Protein des intracytoplasmatischen Membransystems beziehen (OELZE u. DREWS, 1972), daß also Zellen mit geringer entwickeltem intr cytoplasmatischen Membransystem eine höhere Aktivität je Membranoberflächeneinheit besitzen. Die Gesamtaktivität in der Zelle bleibt damit konstant, wenn sich die Ausbildung des intracytoplasmatischen Membransystems in der Zelle durch Anpassung an die mikroaero-

ben Bedingungen verringert. Die Wachstumsgeschwindigkeit sollte deshalb trotz Zunahme der spezifischen Aktivität der Enzyme des ETS unverändert bleiben, was auch gefunden wurde.

Wie wir bereits festgestellt haben, vollzieht sich die Atmung phototropher Zellen derjenigen Arten, die bei vollem pO_2 wachsen können, ebenso wie die der mikroaeroben Arten am ETS I. Wenn man fakultativ aerobe Arten nun ebenfalls unter mikroaeroben Bedingungen wachsen läßt, so sollte auch in solchen Zellen ausschließlich oder ganz überwiegend das ETS I ausgebildet sein, denn wie man weiß, löst die Absenkung des pO_2 die Bildung der intracytoplasmatischen Membranen aus, auf denen das ETS I lokalisiert ist.

Das ETS mikroaerob kultivierter Zellen von Rp. acidophila konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht untersucht werden; es gibt jedoch Untersuchungen an Rp. sphaeroides, die diese Annahme voll bestätigen (SASAKI et al., 1970; SAUNDERS u. JONES, 1974): Wurden aerobe Kulturen unter semiaerobe Bedingungen gebracht, so änderte sich die Cytochrom-Zusammensetzung der Zellen in gleicher Weise wie bei Umstellung auf anaerob-phototrophe Bedingungen. Ähnlich wie es für Rp. acidophila bei entgegengesetzter Umstellung beschrieben wurde, nahm das unter aeroben Bedingungen vorherrschende Cytochrom vom a-Typ ab, während das für das ETS I charakteristische Cytochrom vom o-Typ zunahm.

Das Wachstumsverhalten der braunen Rhodospirillen unter verschiedenen Kulturbedingungen kann nun biochemisch verständlich gemacht werden. Unter mikroaeroben Bedingungen wird das Wachstum durch ein Elektronentransportsystem (ETS I), das in allen Rhodospirillaceae vorkommt und das an das intracytoplasmatische Membransystem gebunden ist, ermöglicht. Dieses ETS I wird, unabhängig vom Membrangehalt der Zellen, bei Einwirkung eines hohen Sauerstoffpartialdruckes nach etwa einer Generation abgebaut. Während die fakultativ aeroben Rhodospirilla-

ceen-Arten dann ein neues, an die Cytoplasmamembran gebundenes Elektronentransportsystem ausbilden, sind braune Rhodospirillen dazu nicht in der Lage und müssen ihr Wachstum einstellen. Dieser Wachstumsstillstand tritt bei hohem Sauerstoffpartialdruck schlagartig ein und wird durch Entkopplung der Energiegewinnung von der Atmung verursacht; erst danach wird auch das ETS I inaktiviert.

Entwicklungsgeschichtlich betrachtet sind die fakultativ aeroben Rhodospirillaceae mit ihrer Fähigkeit zu rein chemoorganotropher Lebensweise die am höchsten entwickelten phototrophen Bakterien mit der größten ökologischen Valenz. Da die braunen Rhodospirillen ein Elektronentransportsystem, das sie zu voller aerober Atmung befähigen würde, nicht ausbilden konnten, haben sie bei der gegenwärtigen Erdatmosphäre im sauerstoffgesättigten Wasser keine Lebensmöglichkeit. Sie finden ihre besten Entwicklungsbedingungen in den belichteten, anaeroben Teilen natürlicher Gewässer, wo sie einfache organische Verbindungen aus dem anaeroben Abbau organischer Substanzen photoassimilieren. Im Dunkeln vermögen sie ihren Energiestoffwechsel unter mikroaeroben Bedingungen durch ihre an das ETS I gebundene schwache Atmung aufrechtzuerhalten. Ihre Fähigkeit zu einem entkoppelten Elektronentransport bei höherer Sauerstoffkonzentration könnte sich unter gewissen Verhältnissen günstig auswirken, da durch die damit verbundene starke Sauerstoffzehrung lokal wieder geeignete Entwicklungsbedingungen eintreten können. Tatsächlich geht auch aus den wenigen Angaben, die zur Verbreitung der braunen Rhodospirillen vorliegen, hervor, daß sie keineswegs nur in ständig anaerobem Milieu vorkommen, sondern auch aus sauerstoffreicheren Gewässerzonen isoliert werden konnten (GIESBERGER, 1947; BIEBL u. DREWS, 1969; BIEBL, 1973). Weil das photosynthetische Membransystem der braunen Rhodospirillen unter Bedingungen, unter denen es bei den fakultativ aeroben Bakterien verschwindet, weitgehend erhalten bleibt, kann die Photosynthese sofort einsetzen, wenn anaerobe Bedingungen eintreten.

Bei geringer Lichtintensität sind sie wegen ihres höheren spezifischen Photosynthesepigment-Gehaltes gegenüber anderen Rhodospirillaceae konkurrenzfähig.

VII. ZUSAMMENFASSUNG

In der vorliegenden Arbeit wurde von den braun gefärbten Arten der Gattung Rhodospirillum, die nach Beobachtungen von PFENNIG im Dunkeln nur mikroaerob wachsen können, der Sauerstoffpartialdruck (pO_2)-Bereich für das Wachstum im Dunkeln ermittelt. Die relevanten Enzyme und Cytochrome des unter mikroaeroben Bedingungen wirksamen Elektronentransportsystems wurden untersucht und mit denen aus phototroph gewachsenen Zellen verglichen. Zusätzlich wurden Untersuchungen zum Wachstum und zum Elektronentransport bei einer Rhodospirillaceen-Art durchgeführt, die außer anaerob im Licht auch bei atmosphärischem Sauerstoffpartialdruck wachsen kann. Dazu wurde die physiologisch noch wenig charakterisierte Art Rhodopseudomonas acidophila verwendet.

1. Für die Kultur phototropher Bakterien wurde eine Fermenteranlage entwickelt, die sowohl für anaerobes Wachstum im Licht als auch für Wachstum unter kontrolliertem Sauerstoffpartialdruck geeignet war.
   Die Anlage zeichnete sich durch folgende Konstruktionsmerkmale aus: Freistehendes Kulturgefäß mit Magnetantrieb von unten und allseitiger Beleuchtung mit wassergekühlten Glühlampen (maximale Beleuchtungsstärke 80.000 Lux). Probenahme-Beimpfungsvorrichtung mit sterilisierbarem Dreiwegehahn und Schraubanschluß für sterile Flaschen. Sauerstoffmeß- und Regeleinrichtung für genaue Konstanthaltung des pO_2 ($\pm$ 0,3 Torr), besonders im Bereich von 0 bis 10 Torr. Meßanlage mit thermischem Durchflußmesser, paramagnetischem Sauerstoffanalysator und Ultrarot-CO_2-Analysator zur Bilanzierung des Gasstoffwechsels.

2. Ein andauerndes Wachstum der braunen Rhodospirillen unter mikroaeroben Bedingungen war bei Rhodospirillum fulvum nur unterhalb eines pO_2 von 11 Torr möglich, bei R. molischianum war der Grenz-pO_2 7 Torr und bei R. photometricum weniger als 4 Torr. Ungefähr 5 Torr oberhalb dieser Grenze kam das Wachstum etwa nach einer Generation zum Stillstand. Bei noch höherem pO_2 wuchsen die Zellen nicht. Die höchste Wachstumsgeschwindigkeit (kürzeste Verdopplungszeit R. fulvum 18 h und R. molischianum 23 h) wurde an der pO_2-Grenze gemessen; bei weiterer pO_2-Absenkung verlangsamte sich das Wachstum. Aerob im Licht wuchsen R. moli-

schianum und R. photometricum im gleichen pO_2-Bereich wie im Dunkeln; R. fulvum konnte auch noch bei pO_2 150 Torr kultiviert werden, solange die Zellen noch Bacteriochlorophyll (Bchl.) enthielten. Rp. acidophila wuchs sowohl aerob im Licht als auch im Dunkeln unabhängig vom Bchl.-Gehalt.
Die Messungen der Sauerstoffverbrauchsrate im Fermenter ergaben eine um das Fünffache erhöhte Atmung, wenn der pO_2 plötzlich über den für das Wachstum optimalen pO_2 hinaus erhöht wurde. Dies wurde als Entkopplung der Energiegewinnung vom Elektronentransport gewertet und als eine Ursache für die Unfähigkeit zu voll aerobem Wachstum angesehen.

3. Die braunen Rhodospirillen hatten bei optimalem mikroaerobem Wachstum einen hohen Bchl.-Gehalt, der sich bei Absenkung des pO_2 noch erhöhte. In dem pO_2-Bereich, der ein dauerndes Wachstum ermöglichte, wurde Bchl. synthetisiert. Der spezifische Bchl.-Gehalt war sowohl bei phototrophem als auch mikroaerobem Wachstum höher als der von Rp. acidophila unter vergleichbaren Bedingungen. Aerobe Zellen von Rp. acidophila hatten in einem pO_2-Bereich von 30-100 Torr einen spezifischen Bchl.-Gehalt von etwa 6 µg/mg Protein, unterhalb von pO_2 30 Torr stieg der Gehalt steil an, über 130 Torr sank er auf 1 µg/mg Protein ab.

4. Bei R. fulvum waren die spezifischen Aktivitäten der NADH-Oxidase, Succinat-Oxidase, Cytochrom-c-Oxidase und NADH-Cyt.c-Reduktase bei anaerob im Licht und mikroaerob im Dunkeln gewachsenen Zellen gleich hoch. Bei der NADH- und Succinat-Oxidase blieben beim Übergang von anaerob-Licht auf mikroaerob-Dunkel der "K_m-Wert", das pH-und Temperatur-Optimum unverändert, die Arrhenius-Aktivierungsenergie nahm um 20% bzw. 25% ab. Die Hemmbarkeit der Succinat-Oxidase durch KCN verringerte sich um den Faktor 8, die der NADH-Oxidase blieb gleich. Der Cytochrom-Gehalt war unter mikroaeroben Bedingungen geringer, Cytochrom "o" ging sehr stark zurück, die Cytochrome $c_{2(549)}$ und b_{558} in geringerem Maße. Bei R. molischianum waren die Verhältnisse sehr ähnlich.

5. Bei Rp. acidophila waren die Aktivitäten der NADH-Oxidase, Succinat-Oxidase und der NADH-Cyt.c-Reduktase in aerob gewachsenen Zellen etwa doppelt so hoch wie in phototroph angezogenen Zellen; die Aktivität der Cyt.c-Reduktase war viermal so hoch. Die

NADH-Oxidase hatte ein pH-Optimum von pH 9,0 gegenüber pH 5,0 in phototrophen Zellen. Das Temperaturoptimum lag um 5° C unter dem der NADH-Oxidase phototropher Zellen; die Arrhenius-Aktivierungsenergie war in den aeroben Zellen um 40% niedriger. Bei der Succinat-Oxidase wurde in aeroben Zellen ein niedrigerer "K_m-Wert" gefunden; die Arrhenius-Aktivierungsenergie betrug 65% des in phototrophen Zellen bestimmten Wertes. Die Hemmbarkeit der Succinat-Oxidase durch KCN, TTFB und CCCP war in den aeroben Zellen 45, 11 bzw. 12mal geringer als in phototrophen Zellen.

In Rp. acidophila wurden zwei Cytochrome vom c-Typ, das lösliche Cyt.c_{551} und das membrangebundene Cyt.c_{554}, sowie Cyt.$b_{560-561}$ gefunden. Der Gehalt an Cyt.c_{551} war in beiden Zellarten gleich, Cyt.c_{554} in aeroben Zellen vermindert und Cyt.$b_{560-561}$ stark erhöht. Außerdem konnten drei CO-bindende Cytochrome unterschieden werden (Indexzahl = Absorptionsminimum vor der α-Bande): Cyt.$c_{551(CO)}$ kam in beiden Zellarten vor, während Cyt.$c_{558(CO)}$ und Cyt.$_{562(CO)}$ fast ausschließlich in aeroben Zellen erschienen.

6. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen, daß die braunen Rhodospirillen neben dem photosynthetischen nur ein oxidatives Elektronentransportsystem (ETS) besitzen, das an das intracytoplasmatische Membransystem gebunden ist und unter mikroaeroben Wachstumsbedingungen in bestimmten Grenzen modifiziert werden kann. Rp. acidophila hat unter phototrophen und mikroaeroben Bedingungen entsprechende ETS-Systeme. Bei hohem pO_2 wird ein neues oxidatives Elektronentransportsystem gebildet, das an die Cytoplasmamembran gebunden ist. Das an die intracytoplasmatischen Membranen gebundene oxidative Elektronentransportsystem der phototrophen und mikroaeroben Zellen wird sowohl bei Rp. acidophila als auch bei den braunen Rhodospirillen bei hohem Sauerstoffpartialdruck abgebaut. Da die braunen Rhodospirillen nicht in der Lage sind ein cytoplasmamembrangebundenes oxidatives ETS zu bilden, ist ihr Wachstum im Dunkeln an den niedrigen pO_2-Bereich gebunden, in dem die Bildung des photosynthetischen Membransystems noch nicht reprimiert ist.

VIII. LITERATURVERZEICHNIS

ASANO, A.
BRODIE, E.F.
1964 Oxidative phosphorylation in fractionated bacterial systems. XIV Respiratory chains of Mycobacterium phlei.
J. Biol. Chem. 239, 4280-4291

ASANO, A.
COHEN, N.S.
BAKER, R.F. et al.
1973 Orientation of the cell membrane in ghosts and electron transport particles of Mycobacterium phlei.
J. Biol. Chem. 248, 3386-3397

BACCARINI-MELANDRI, A.
ZANONI, D.
MELANDRI, B.A.
1973 Energy transduction in photosynthetic bacteria. VI Respiratory sites of energy conservation in membranes from dark-grown cells of Rhodopseudomonas capsulata.
Biochim. et Biophys. Acta 314, 298-311

BARTSCH, R.G.
1968 Bacterial cytochromes.
Ann. Rev. Microbiol. 22, 181-200

BEISENHERZ, G.
BOLTZE, H.J.
BÜCHER, Th.
CZOK, R. et al.
1953 Diphosphofructose-Aldolase, Phosphoglycerinaldehyd-Dehydrogenase, Glycerophosphat-Dehydrogenase und Pyruvat-Kinase aus Kaninchenmuskulatur in einem Arbeitsgang.
Z. Naturf. 8B, 555-577

BENING, G.J.
EILERMANN, L.J.M.
1973 Oxidative phosphorylation in Azotobacter vinelandii. Energy-linked pH changes and fluorescence changes of atebrin and 1-Anilino-naphthalene-8-sulphonate.
Biochim. et Biophys. Acta 292, 402-412

BERDEN, J.A.
SLATER, E.C.
1970 The reaction of antimycin with a cytochrome b preparation active in reconstitution of the respiratory chain.
Biochim. et Biophys. Acta 216, 237-249

BEUSCHER, N.
MAYER, F.
GOTTSCHALK, G.
1974 Citrate lyase from Rhodopseudomonas gelatinosa: Purification, electron microscopy and subunit structure.
Arch. Microbiol. 100, 307-328

BIEBL, H.
1973 Die Verbreitung der schwefelfreien Purpurbakterien im Plussee und anderen Seen Ostholsteins.
Dissertation, Freiburg i. Br.

BIEBL, H.
DREWS, G.
1969 Das in-vivo-Spektrum als taxonomisches Merkmal zur Verbreitung von Athiorhodaceae.
Zentr. Bakteriol. Parasitenk., 2. Abt., 123, 425-452

BIEDERMANN, M.
DREWS, G.
MARX, R.
SCHRÖDER, J.
1967 Der Einfluß des Sauerstoffpartialdruckes und der Antibiotica Actinomycin und Puromycin auf das Wachstum, die Synthese von Bacteriochlorophyll und die Thylakoidmorphogenese in Dunkelkulturen von Rhodospirillum rubrum.
Arch. Mikrobiol. 56, 133-147

BRODA, E.
1970 The evolution of bioenergetic processes.
Progr. Biophys. Mol. Biol. 21, 143-208

BÜCHEL, K.H.
KORTE, F.
BEECHEY, R.B.
1965 Entkopplung der oxydativen Phosphorylierung in Mitochondrien durch NH-acide Benzimidazole.
Angew. Chem. 77, 814

BUTLIN, J.D.
COX, G.B.
GIBSON, F.
1973 Oxidative phosphorylation in Escherichia coli K-12:
The genetic and biochemical characterisation of a strain carrying a mutation in the unc B gene.
Biochim. Biophys. Acta 292, 366-375

CELLARIUS, R.A. 1969 The incorporation of Bacteriochlorophyll into photosynthetic membranes of nonsulfur purple bacteria. Progress in Photosynthesis Research, Vol. II, 655-661. Hrsg. H. Metzner, Univ. Tübingen

CHANCE, B. WILLIAMS, G.R. 1956 The respiratory chain and oxidative phosphorylation. In Advances in Enzymology, Vol. 17 pp. 67. Ed. Nord, F.F.; Interscience Publishers, N. York

CLARK, L.C. 1956 Monitornig and control of blood and tissue oxygen tension. Trans. Am. Soc. Artificial Internal. Organs 2, 41-65

CLAYTON, R.K. 1955 Competition between light and dark metabolism in Rhodospirillum rubrum. Arch. Mikrobiol. 22, 195-203

COHEN-BAZIRE, G. 1966 The procaryotic photosynthetic apparatus. In 'The Chlorophylls', Ed. Vernon, L.P. and Seely, R.; Academic Press, N. York-London

COHEN-BAZIRE, G. SISTROM, W.R. STANIER, R.Y. 1957 Kinentic studies of pigment synthesis by non-sulfur purple bacteria. J. Cell. Comp. Physiol. 49, 25-68

DALTON, H. POSTGATE, J.R. 1969 Effect of oxygen on growth of Azotobacter chroococcum in batch and continous culture. J. gen. Microbiol. 54, 463-473

DANIEL, R.M. REDFEARN, E.R. 1967 The reduced nicotinamide adenine dinucleotide oxidase system of Acetobacter suboxydans. Biochem. J. 106, 49-50, zit. nach PFITZNER, 1969

DAVIES, P.W. 1962 Physical Techniques in Biological Research, W.H. Nastuk, ed. Vol. IV S. 137, Academic Press, N. York, zit. aus LESSLER, 1972

DAVIES, R.C.
GORCHEIN, A.
NEUBERGER , A. et al. 1973 Biosynthesis of bacteriochlorophyll.
Nature 245, 15-19

DIXON, M.
WEBB, E.C. 1964 Enzymes.
Longmans, 2. Ed.,London

DREWS, G. 1972 Die photosynthetischen Bakterien als Modelle zur Untersuchung von zellulären Differenzierungsprozessen.
Naturw. Rdsch. 25, 213-220

DREWS, G.
GIESBRECHT, P. 1963 Zur Morphogenese der Bakterien-"Chromatophoren" (-Thylakoide) und zur Synthese des Bacteriochlorophylls bei Rhodopseudomonas spheroides und bei Rhodospirillum Rubrum.
Zentr. Bakteriol. Parasitenk. I Abt. 190, 503-536

DREWS, G.
LAMPE, H.-H.
LADWIG, R. 1969 Die Entwicklung des Photosyntheseapparates in Dunkelkulturen von Rhodopseudomonas capsulata.
Arch. Mikrobiol. 65, 12-28

DROZD, J.
POSTGATE, J.R. 1970 Interference by oxygen in the acetylene reduction test for aerobic nitrogen fixing bacteria-
J. gen. Microbiol. 60, 427-429

GIESBERGER, G. 1947 Some observations on the culture, physiology and morphology of some brown-red Rhodospirillum species.
Leeuwenhoek Ned. Tijdschr. 13, 135-148

GÖBEL, F. 1973 Quantum efficiency Experiments with purple non-sulfur Bacteria, Abstracts of symposium on prokaryotic photosynthetic organisms.
Freiburg i. Br.

GUTMAN, M
SINGER, T.P.
BEINERT, H. et al.
1970 Reaction sites of rotenone, piericidin A and amytal in relation to the nonheme iron components of NADH dehydrogenase.
Proc. Nat. Acad. Sci. USA 65, 763-770

HAMILTON, I.D.
HOLMES, W.H.
1970 Measurement of respiration of micro-organisms during batch culture.
Laboratory Practice 19, 795-807

HEATLY, N.G.
1950 A versatile fermentation sampling arrangement.
J. gen. Microbiol. 4, 410-412

HERBERT, D.
ELSWORTH, R.
TELLING, R.C.
1956 The continous culture of bacteria; a theoretical and experimental study.
J. gen. Microbiol. 14, 601-622

HIGASI, T.
BOGIN, E.
BRODIE, A.F.
1969 Separation of a factor indispensable for coupled phosphorylation from the particulate fraction of Mycobacterium phlei.
J. Biol. Chem. 244, 500-508

HILLER, A.
PLAZIN, J.
SLYKE, D.D. van
1948 A study of conditions for Kjeldahl determination of nitrogen in proteins.
J. Biol. Chem. 176, 1401-1420

HIND, G.
OLSON, J.M.
1968 Electron transport pathways in photosynthesis.
Ann. Rev. Plant Physiol. 19, 249-282

HORIO, T.
KAMEN, M.D.
1970 Bacterial cytochromes: II functional aspects.
Ann. Rev. Microbiol. 24, 399-428

HOWELL, S.H.
MOUDRIANAKIS, E.N.
1967 Function of the quantasome in photosynthesis: Structure and properties of membrane bound particle, active in the dark reactions of photophosphorylation.
Proc. Nat. Acad. Sci., USA 58, 1261-1268

HUMPHRIES, E.C. 1956 Mineral components and ash analysis. In: Moderne Methoden der Pflanzenanalyse Br. 1, Hrsg. Peach, K. and Tracy, M.V. Springer-Verlag, Berlin-Göttingen-Heidelberg

JANDER, G.
JAHR, K.F. 1959 Maßanalyse. Göschen, Berlin

JOHNSON, M.J.
BORKOWSKI, J.
ENGBLOM, C. 1964 Steam sterilizable probes for dissolved oxygen measurement. Biotechnology and Bioengineering VI, 457-468

JOHNSTON, J.A.
BROWN, A.H. 1954 The effect of light on the oxygen metabolism of the photosynthetic bacterium Rhodospirillim rubrum. Plant Physiology (Tokyo) 29, 177-182

JONES, C.W.
REDFEARN, E.R. 1967 The cytochrome system of Azotobacter vinelandii. Biochim. Biophys. Acta 143, 340-353

JONES, O.T.G.
WHALE, F.R. 1970 The oxidation and reduction of pyridine nucleotides by Rhodopseudomonas spheroides and Chlorobium thiosulfatophilum. Arch. Mikrobiol. 72, 48-59

KAMEN, M.D. 1963 Extemporaneous remarks by way of summary. In: Bacterial photosynthesis. Ed. H. Gest, A. San Pietro u. L.P. Vernon, Antioch Press, Yellow Springs, Ohio

KEISTER, D.L.
MINTON, N.J. 1969 Energy-linked reactions in photosynthetic bacteria. IV. Interaction of the photochemical and respiratory systems of Rhodospirillum rubrum. Progress in photosynthesis research. Ed. Helmut Metzner, Tübingen, Vol. III 1299-1305

KEISTER, D.L.
YIKE, N.J.
1967 Energy-linked reactions in photosynthetic bacteria. II. The energy-dependent reduction of oxidized nicotinamide-adenine nucleotide phosphate by reduced nicotinamide-adenine nucleotide in chromatophores of Rhodospirillum rubrum. Biochemistry 6, 3847-3857

KIKUCHI, G.
MOTOKAWA, Y.
1968 Cytochrome oxidase of Rhodopseudomonas spheroides. In: Structure and function of cytochromes. Univ. of Tokyo Press, Tokyo

KLEMME, J.H.
1967 Hydrogenase und photosynthetischer Elektronentransport bei Rhodospirillum rubrum und Rhodopseudomonas capsulata. Dissertation, Univ. Göttingen

KLEMME, J.H.
SCHLEGEL, H.G.
1969 Untersuchungen zum Cytochrom-Oxydase-System aus anaerob im Licht und aerob im Dunkeln gewachsenen Zellen von Rhodopseudomonas capsulata. Arch. Mikrobiol. 68, 326-354

KÖNIG, C
1967 Über die Kultur von Hydrogenomonas H16 im Chemostaten unter chemoorganotrophen Bedingungen. Dissertation, Univ. Göttingen

KOHLMILLER, E.F.
GEST, H.
1951 A comparative study of the light and dark fermentations of organic acids by Rhodospirillum rubrum. J. Bact. 61, 269-282

KOSHLAND, D.E. jr.
NÉMETHY, G.
FILMER, D.
1969 Comparison of experimental binding data and theoretical models in proteins containing subunits. Biochemistry 5, 365-385

KREBS, W.M.
HADDAD, I.A.
1972 The oxygen electrode in fermentation systems. Vol. 13, Developments in Industrial Microbiology. American Institute of Biological Sciences, Washington, D.C.

LA RIVIÈRE, J.W.M. 1958 On the microbial metabolism of the tartaric acid isomers. Dissertation Technische Hogeschool, Delft

LEHMANN, H. 1973 Zur Technik der Massenkultur phototropher Bakterien im Glühlampenlicht und mikroaerob im Dunkeln. 3. Symposium Technische Mikrobiologie, H. Dellweg Hrsg., Institut Gärungsgewerbe und Biotechnologie, Berlin

LESSLER, M.A. 1972 Macro and micro-oxygen electrode techniques for cell measurement. Methods in Cell Physiology, Vol. V, Academic Press Inc., New York and London

LESSLER, M.A.
MOLLOY, E.
SCHWAB, C.M. 1966 Automated oxygen electrode measurements of the oxidative activity of biological systems. Symposium on the YSI Oxygen Monitor, Shandon Scientific Co. Ltd., London

MAHLER, H.R.
CORDES, E.H. 1969 Biological Chemistry.
Harper Intern. Ed., Harper & Row, New York

MARRS, B.
GEST, H. 1973 Regulation of bacteriochlorophyll synthesis by oxygen in respiratory mutants of Rhodopseudomonas capsulata.
J. Bact. 114. 1052-1057

MASSEY, V. The microestimation of succinate and the extinktion coefficient of cytochrome c.
Biochim. Biophys. Acta 34, 255-256

Mc DANIEL, L.E.
BAILEY, E.G.
ZIMMERLI, A. 1965 Effect of oxygen supply rates on growth of Escherichia coli.
II. Comparison of results in shake flacks and 50-liter fermentor.
Appl. Microbiol. 13, 115-119

MOLISCH, H. 1907 Die Purpurbakterien nach neuen Untersuchungen.
S. 24, Fischer Verlag, Jena

MONOD, J. 1942 Recherches sur la croissance des cultures bactériennes.
Hermann & Cie., Paris

MOTOKAWA, Y.
KIKUCHI, G. Cytochrome systems in dark-aerobically grown Rhodopseudomonas spheroides.
Biochim. Biophys. Acta 120, 274-281

MURAKAMI, S. 1968 On the nature of the particles attached to the thylakoid membrane of spinach chloroplasts, p. 82-88 in: Comparative Biochemistry and Biophysics of Photosynthesis. Ed. K. Shibata, A. Takamiya, A.T. Jagendorf, R.C. Fuller, Univ. of Tokyo Press, Tokyo

van NIEL, C.B. 1944 The culture, general physiology, morphology, and classification of the non-sulfur purple and brown bacteria.
Bact. Rev. 8, 1-118

OELZE, J.
DREWS, G.
1972 Membranes of photosynthetic Bacteria.
Biochim. Biophys. Acta 265, 209-239

OELZE, J.
WEAVER, P.
1971 The adjustment of photosynthetically grown cells of Rhodospirillum rubrum to aerobic light conditions.
Arch. Microbiol. 79, 108-121

OLESZKO, S.
MOUDRIANAKIS, E.N.
1974 The visualisation of the photosynthetic coupling factor in embeded spinach chloroplasts.
J. Cell. Biol. 63, 936-948

OWEN, P.
FREER, J.H.
1970 Factors influencing the activity of succinate dehydrogenase in membrane preparations from Micrococcus lysodeikticus.
Biochem. J. 120, 237-243

PFENNIG, N.
1968 Persönliche Mitteilung

PFENNIG, N.
1969 Rhodopseudomonas acidophila sp. n., a new species of the budding purple nonsulfur bacteria.
J. Bacteriol. 99, 597-602

PFENNIG, N.
1970 Dark growth of phototrophic bacteria under microaeroplulic conditions.
J. gen. Microbiol. 61 ii.

PFENNIG, N.
1974 Rhodopseudomonas globiformis, sp.n., a new species of the Rhodospirillaceae.
Arch. Microbiol. 100, 197-206

PFENNIG, N.
EIMHJELLEN, K.E.
JENSEN, S.L.
1965 A new isolate of the Rhodospirillum fulvum group and its photosynthetic pigments.
Arch. Microbiol. 51, 528-

PFENNIG, N.
LIPPERT, K.D.
1966 Über das Vitamin B_{12}-Bedürfnis phototropher Schwefelbakterien.
Arch. Mikrobiol. 55, 258-266

PFENNIG, N.
TRÜPER, H.G. 1971 Type and neotype strains of the species of phototrophic bacteria maintained in pure culture.
Int. J. Syst. Bacteriol. 21, 19-24

PFITZNER, J. 1969 Die NAD-spezifische Hydrogenase und das Elektronentransportsystem von Hydrogenomonas H16.
Dissertation, Göttingen

PIRT, S.J.
CALLOW, D.S. 1958 Exocellular product formation by microorganisms in continous culture. I. Product of 2:3 Butanediol by Aerobacter aerogenes in a single stage process.
J. appl. Bact. 21, 188-205

RING, K.
SCHLECHT, S.
ESCHWEILER, W.
KUTSCHER, J. 1969 Eine Elektrode zur kontinuierlichen Messung des Gelöstsauerstoffs (pO_2) in Fermenterkulturen.
Arch. Microbiol. 65, 48-60

SASAKI, T.
MOTOKAWA, Y.
KIKUCHI, G. 1970 Ocurrence of both a-type and o-type cytochromes as the functional terminal oxidases in Rhodopseudomonas spheroides.
Biochim. Biophys. Acta 197, 284-291

SATOH, T.
HOSHINO, Y.
KITAMURA, H. 1974 Isolation of denitrifying photosynthetic bacteria.
Agr. Biol. Chem. 38, 1749-1751

SAUNDERS, V.A.
JONES, O.T.G. 1974 Properties of the cytochrome a-like material developed in the photosynthetic bacterium Rhodopseudomonas spheroides when grown aerobically.
Biochim. Biophys. Acta 333, 439-445

SCHMIDT, K.
LIAAEN-JENSEN, S.
SCHLEGEL, H.G. 1963 Die Carotinoide der Thiorhodaceae.
Arch. Microbiol. 46, 117-126

SIEGEL, J.M.
MONTGOMERY, G.A.
BOCK, R.M. 1959 Arch. Biochem. Biophysics 82, 288, zit. aus Biochemica Informationen, Boehringer, Mannheim 1969

SISTROM, W.R. 1965 Effect of oxygen on growth and the synthesis of bacteriochlorophyll in Rhodospirillum molischianum. J. Bact. 89, 403-408

TABER, H.W.
MORRISON, M. 1964 Electron transport in Staphylococci. Properties of a particle preparation from exponential phase Staphylococcus aureus. Arch. Biochem. Biophys. 105, 367-379

TANIGUCHI, S.
KAMEN, M.D. 1965 The oxidase system of heterotrophically-grown Rhodospirillum rubrum. Biochim. Biophys. Acta 96, 395-428

TAUSCHEL, H.D.
HOENIGER, F.M. 1974 The fine structure of Rhodopseudomonas acidophila. Can. J. Microbiol. 20, 13-17

THORE, A.
KEISTER, D.L.
SAN PIETRO, A. 1969 Studies on the respiratory system of aerobically (dark) and anaerobically (light) grown Rhodospirillum rubrum. Arch. Mikrobiol. 67, 378-396

TRUESDALE, G.A.
DOWNING, A.L.
LOWDEN, G.F. 1955 The solubility of oxygen in pure water and sea-water. J. appl. Chem. 5, 53-62

ULICH, H.
JOST, W. 1970 Kurzes Lehrbuch der Physikalischen Chemie. Dr. Dietrich Steinkopff Verlag, Darmstadt

UFFEN, R.L. 1973 Growth properties of Rhodospirillum rubrum mutants and fermentation of pyruvate in anaerobic, dark conditions. J. Bact. 116, 874-884

UMBREIT, W.W.
BURRIS, R.H.
STAUFFER, J.F. 1964 Manometric Techniques. Burgess Publishing Co, Minneapolis

VALENTINE, R.C.
SHAPIRO, B.M.
STADTMAN, E.R.
1968 Regulation of glutamine synthetase. XII Electron microscopy of the enzyme from E.coli. Biochemistry 7, 2143-2152

WESTON, J.A.
KNOWLES, C.J.
1974 The respiratory system of the marine bacterium Beneckea natriegens. I. Cytochrome composition. Biochim. Biophys. Acta 333, 228-236

WESTON, J.A.
KNOWLES, C.J.
1973 A soluble CO-binding c-Type Cytochrome from the marine bacterium Beneckea natriegens. Biochim. Biophys. Acta 305, 11-18

WIEGEL, J.
1974 Die α-Isopropylmalat-Synthase in Hydrogenomonas eutropha H16. Dissertation, Göttingen

YAMASHITA, J.
YOSHIMURA, S.
MATUO, Y.
HORIO, T.
1967 Relationship between photosynthetic and oxidative phosphorylations in chromatophores from light-grown cells of Rhodospirillum rubrum. Biochim. Biophys. Acta 143, 154-172

ZANONI, D.
BACCARINI MELANDRI, A.
MELANDRI, B.A. et al.
1974 Energy transduction in photosynthetic bacteria. The nature of cytochrome c oxidase in the respiratory chain of Rhodopseudomonas capsulata. FEBS-Letters 48, 152-155

An dieser Stelle möchte ich Herrn Prof. Dr. N. Pfennig für die Anregung zu diesem Thema und die mir stets gewährte Unterstützung danken.

Für die Durchführung und Diskussion der elektronenmikroskopischen Untersuchungen danke ich Herrn Prof. Dr. F. Mayer.

Herr Prof. Dr. J.-H. Klemme wies mich in die Untersuchungsmethoden des Elektronentransports ein, wofür ich ihm Dank schulde.

Ohne die Hilfe von Herrn K. Bertram, der elektronische Schaltungen für die Sauerstoffregelung entwarf und herstellte, sowie den Herren F. Bollensen und J. Steckel, welche Fermenterbauteile anfertigten, wären die Versuche nicht möglich gewesen.

Herrn Prof. Dr. G. Jacobi und Herrn Dr. G. Harnischfeger sei für die Überlassung des Shimadzu-Spektralphotometers und die entsprechende Anleitung gedankt.

Besonders danke ich Herrn Dr. H. Biebl für die intensive Diskussion der Arbeit.

LEBENSLAUF

Am 11.11.1935 wurde ich als Sohn des Bau-Ingenieurs Vinzenz Lehmann und der Dolmetscherin Maria Lehmann geb. Danzinger in Valparaíso/Chile geboren. Von 1941 bis 1945 besuchte ich in Thiersee bei Kufstein/Tirol die Volksschule, danach bis 1946 das Gymnasium in Klagenfurt und bis 1950 das Liceo alemán in Santiago/Chile. Von Ende 1950 bis 1953 absolvierte ich die Höhere Landwirtschaftsschule "Adolfo Matthei" in Osorno/Chile mit Abschluß als "Perito agrícola" und 1962 einen Studiengang an der Ingenieurschule für tropische und subtropische Landwirtschaft in Witzenhausen, den ich als Ing. agr. trop. (grad.) bestand. In der Zwischenzeit und bis zur Hochschulreifeprüfung Ende 1964 war ich in der Landwirtschaft in Chile, USA und Schweden und im kaufmännischen Beruf in der BRD tätig. Nebenbei beschäftigte ich mich mit den Fächern Botanik, Bodenkunde und Bienenkunde an der Landwirtschaftlichen Hochschule Hohenheim und der T.U. Berlin.

Im WS 1964/65 begann ich mit dem Studium der Landwirtschaft an der T.H. München, setzte es 1966 an der Georg-August-Universität in Göttingen fort und schloß es im Oktober 1968 mit dem Diplom in Landwirtschaft ab. Dem ging die Anfertigung einer Diplomarbeit mit dem Thema "Mikrobiologische Vergleichsuntersuchungen an benachbarten Waldstandorten mit neutraler und saurer Reaktion" bei Herrn Prof. Dr. B. Meyer voraus.

Danach studierte ich das Fach Mikrobiologie an der math. nat. Fakultät derselben Universität und begann Anfang 1970 unter der Leitung von Prof. Dr. N. Pfennig mit der Arbeit an der vorliegenden Dissertation. Seit Oktober 1971 war ich als wissenschaftlicher Mitarbeiter am Institut für Mikrobiologie beschäftigt. Seit dem 1. März dieses Jahres arbeite ich am Institut für Pflanzenpathologie und Pflanzenschutz der Universität Göttingen.